

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Regeneración caudal en especies de Allolobophora  
(Annelida: Oligochaeta) : mecanismos de control y  
neurosecreción**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Encarnación Sequeros Jiménez**

DIRECTOR:

**Rafael Alvarado Ballester**

**Madrid, 2015**

Encarnación Sequeros Jiménez



\* 5 3 0 9 8 6 7 2 0 3 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-017803-5

REGENERACION CAUDAL EN ESPECIES DE ALLOLOBOPHORA  
(ANNELIDA: OLIGOCHAETA). MECANISMOS DE CONTROL Y NEUROSECRECION

Departamento de Zoología de Invertebrados no Artrópodos  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1984



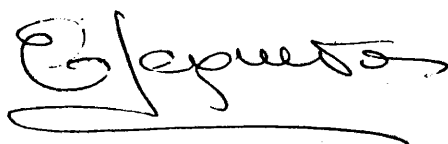
BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

208/84

© Encarnación Sequeros Jiménez  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1984  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-20410-1984

ENCARNACION SEQUEROS JIMENEZ

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'E. Sequeros', with a long horizontal flourish underneath.

REGENERACION CAUDAL EN ESPECIES DE  
ALLOLOBOPHORA (ANNELIDA: OLIGOCHAETA)  
MECANISMOS DE CONTROL Y NEUROSECRECION.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.  
FACULTAD DE BIOLOGÍA.  
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA.

MADRID, 1983.

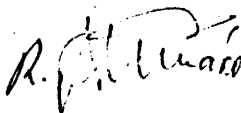


Esta TESIS DOCTORAL se ha realizado bajo la Dirección del Dr. Rafael Alvarado Ballester, catedrático de Zoología de Invertebrados no Artropodos, y bajo la Codirección de la Dra. Mercedes Alonso Bedate, Agregada de Fisiología animal.

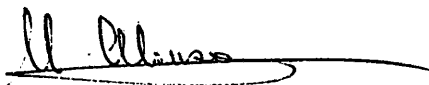
Madrid, 20 de Enero de 1983.

Vº Bº

Director



Codirectora





A mis padres.

A mi esposo

A mis hijos





### AGRADECIMIENTO

---

Quiero expresar ante todo mi más sincero reconocimiento y gratitud a la Doctora Mercedes Alonso Bedate, Profesora Agregada de Fisiología animal y codirectora de esta tesis, que, con su estímulo y ayuda constante, hizo posible la realización de este trabajo.

Deseo agradecer profundamente al Profesor Dr. Rafael Alvarado, Catedrático de Zoología de Invertebrados no Artrópodos y Director de esta Tesis, su orientación, así como la ayuda prestada, poniendo a mi alcance toda la Bibliografía y cuanto material de Laboratorio necesité en mis investigaciones.

Igualmente deseo expresar vivamente mi agradecimiento al Profesor D. Arsenio Fraile Ovejero, Catedrático de Fisiología animal por su ayuda incondicional y el haber permitido que realizara todos mis trabajos experimentales en el Laboratorio de Embriología y Fisiología del Desarrollo, dependiente de su Departamento.

Quiero también hacer constar mi más respetuosa gratitud a mi viejo y querido Profesor D. Salustio Alvarado Fernández (q.e.p.d.) bajo cuya guía me inicié en las técnicas histológicas.

Asimismo doy las gracias más expresivas a mis compañeros de Departamento, a los del Departamento de Oncología del Ministerio de Sanidad y a todos los que directa o indirectamente me han ayudado en la realización de esta Tesis Doctoral.



**I N D I C E**

---



INTRODUCCION .....	1
PROPOSITO.....	2
I. <u>REGENERACION</u> .....	4
1.- Procesos histológicos y ultraestructurales.....	4
1 a. Cierre de la herida y formación del tapón cicatricial .....	6
1 b. Desdiferenciación .....	12
1 c. Blastema .....	12
2.- Procesos fisiológicos .....	22
II. <u>SISTEMA NERVIOSO</u> .....	25
1.- Células neurosecretoras .....	27
1 a. Células neurosecretoras de los ganglios cerebroides .....	29
1 b. Células neurosecretoras del ganglio subfa- ríngeo .....	46
1 c. Células neurosecretoras de la cadena nervio- sa ventral .....	47
2.- Control de la regeneración. Neurohormonas .....	51
III.- INFLUENCIA DE LOS CENTROS NERVIOSOS EN LA REGENERA- CION CAUDAL .....	58

A.- Papel de los ganglios cerebroides.....	58
B.- Papel del ganglio subfaríngeo .....	62
C.- Papel de los centros nerviosos anteriores .....	63
D.- Papel de la cadena nerviosa ventral .....	65
E.- Autoinhibición .....	70
IV. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA REGENERACION CAUDAL .....	74
V. REGENERACION - REPRODUCCION .....	78
VI. DIAPAUSA .....	86

#### MATERIAL Y METODOS

---

##### I.- MATERIAL:

1.- <u>Allolobophora molleri</u> .....	90
2.- <u>Allolobophora caliginosa</u> .....	92

##### II.- METODOS DE TRABAJO .....

A.- Microscopia óptica y electrónica .....	93
--	----

B.- Análisis experimental del proceso de regeneración caudal .....	101
---	-----

## RESULTADOS Y DISCUSION

---

I.- ESTUDIO OPTICO Y ULTRAESTRUCTURAL .....	109
1.- Histología de los ganglios cerebroides .....	109
2.- Histología del ganglio subfaríngeo y ganglios de la cadena ventral .....	114
3.- Ultraestructura .....	115
II.- ANALISIS EXPERIMENTAL DEL PROCESO DE REGENERACION ....	119
1.- Injertos de cerebro y corte de cadena nerviosa ...	119
2.- Importancia del grado de desarrollo .....	122
3.- Papel de los ganglios cerebroides .....	125
3 a. Interacción Regeneración-Reproducción .....	127
4.- Papel del ganglio subfaríngeo .....	133
5.- Papel de los centros nerviosos anteriores y de la cadena nerviosa ventral .....	135
6.- Influencia de los factores ambientales en la re- generación caudal .....	138
6 a. Temperatura .....	138
6 b. Grado de humedad .....	154
6 c. Luz .....	155



RESUMEN .....	162
CONCLUSIONES .....	168
BIBLIOGRAFIA .....	172



1

## INTRODUCCION

---

PROPOSITO.

Comenzamos este trabajo con un breve comunicado sobre "Regeneración caudal en algunos Oligoquetos" que llevamos a la IV Bienal de la Real Sociedad de Historia Natural celebrada en Valencia en 1979. El interés despertado nos indujo a profundizar en el estudio de la regeneración y del papel ejercido por los centros nerviosos anteriores sobre la misma.

Además, al ir estudiando la bibliografía de estos animales nos pudimos dar cuenta de la importancia de constatar con nuevos experimentos las conclusiones obtenidas en sus trabajos sobre regeneración caudal por autores tales como HUBL, HERLANT-MEEWIS, SAUSSEY, JUBERTHIE y MESTROV, etc. ya que observamos la existencia de una gran contradicción en las opiniones de los diferentes autores acerca del papel activador o inhibidor de los centros nerviosos anteriores en la regeneración caudal de los Anélidos.

También nos pudimos dar cuenta, a medida que avanzábamos en nuestros trabajos, de que considerar la acción de estos centros nerviosos anteriores aisladamente, había conducido, sin duda, a conclusiones erróneas. Por todo ello, quisimos ver el papel que juegan en la regeneración de los últimos segmentos del cuerpo todos y cada uno de los centros nerviosos anteriores (ganglios supra e infraesofágicos y primeros ganglios de la cadena nerviosa ventral) teniendo en cuenta además otros factores tales como la edad del animal, época

del año, nivel de amputación, temperatura, fotoperíodo, y grado de humedad.

El trabajo experimental fue llevado a cabo en los laboratorios de Zoología de Invertebrados no Artrópodos, y de Fisiología animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad Complutense de Madrid.

La Microscopia Electrónica se realizó en el Departamento de Oncología del Ministerio de Sanidad.

## I. Regeneración

La Regeneración es la respuesta normal de los organismos para restituir las estructuras perdidas por un proceso de multiplicación y diferenciación celular.

La capacidad regenerativa está muy desarrollada en el Phylum Annelida. Estos animales pueden regenerar fácilmente la región anterior y posterior del cuerpo después de ser amputadas. Si la amputación es cefálica el número de segmentos regenerados es típico para cada especie y sólo se regenera un número limitado de segmentos (Berril, 1952). Sin embargo, no hay limitación en la regeneración de los segmentos posteriores.

Los Oligoquetos terrícolas tienen este poder de regeneración principalmente en dirección caudal, siendo la zona de alargamiento, donde se forman los nuevos segmentos, la región que precede al pigidio.

Durante la regeneración podemos distinguir dos procesos: 1) Procesos histológicos y ultraestructurales 2) Procesos fisiológicos.

### 1) Procesos histológicos y ultraestructurales.

El proceso de regeneración en los Anélidos es de epimorfosis (el órgano regenerado suplementa al resto del cuerpo del animal); se forma una yema de regeneración y las par-

tes nuevas se forman a expensas de esa yema.

La regeneración consiste pues, en una serie de transformaciones histológicas en el muñón del órgano amputado primero, y en el blastema de regeneración, después.

Inmediatamente después de la amputación, los tejidos y células del interior del cuerpo salen a la superficie, donde algunas son destruidas y desgarradas al quedar expuestas a un ambiente desfavorable. Después la herida se recubre de epitelio. El tiempo necesario para que el epitelio recubra la herida varía de unos animales a otros, dependiendo también del tamaño de la herida y de otros factores tales como temperatura, etc.

La amputación de la cola en las lombrices provoca la contracción de la capa muscular subepidérmica, es decir, de la musculatura circular, por lo que la herida se estrecha, introduciéndose la epidermis en ésta y recubriéndola.

Se puede decir pues, que en la regeneración la sucesión de los acontecimientos que tienen lugar después de una amputación, es la siguiente:

a) Cierre de la herida; b) Período de desdiferenciación celular, durante el cual se formará el material que servirá para la edificación del blastema; c) Período de multiplicación celular inmediato a la formación de blastema de regeneración, bajo la epidermis de la herida; d) Período de diferenciación celular, durante el cual tendrá lugar la reconstitución de la región amputada.

1.a) Cierre de la herida: formación del tapón cicatricial.

En cuanto a la forma de cierre de la herida, ya Avel (1959), había observado en los Oligoquetos que la amputación de la cola provocaba un cierre de la herida de dos formas diferentes: tipo cerrado y tipo abierto.

En la forma cerrada los celomocitos, es decir, las células libres del fluido celómico, se acumulan a nivel de la amputación y forman un tapón cicatricial recubierto por un epitelio externo, formado por células de la antigua epidermis. Los labios del intestino se aproximan por contracción de la musculatura propia del órgano, mientras que el epitelio interno cierra el tubo digestivo en forma de dedo de guante.

En el tipo abierto el tubo digestivo no se contrae, sino que sale fuera, soldándose sus bordes con la epidermis. No hay pues, formación de tapón cicatricial, que será propio del tipo cerrado.

CHAPRON (1970 a) hace un estudio histológico sobre la regeneración caudal de Eisenia foetida y llega también a la conclusión de que la regeneración caudal depende del cierre de la herida. Si la amputación implica al intestino posterior, es decir, si el intestino endodérmico aflora a la sección, la herida se cierra según el tipo cerrado, o sea se forma un tapón cicatricial, la histólisis del cual directamente condiciona la regeneración. Si por el contrario, el corte se hace a nivel del proctodeo, es decir, en la región más posterior del cuerpo, no se forma tapón cicatricial, el borde del proctodeo

se funde con la epidermis y la cuerda nerviosa vieja envía prolongaciones hacia la epidermis ventral, que aquí no tiene musculatura parietal. La herida se cierra siguiendo el tipo abierto.

Posteriormente, MARCEL (1972 a) hace también un detenido estudio histológico en Eisenia foetida sobre las etapas o fases por las que pasa la regeneración caudal de este animal. Observa las dos formas de cierre de la herida en el mismo nivel de amputación (segmento 50/51), y que es más frecuente el tipo cerrado (80%) que el tipo abierto (20%). Este autor explica el cierre de la herida de la forma que sigue: cuando el último disepimento (50/51) permanece en la parte posterior extirpada o cuando fuera dañado por el microescalpelo, el metamerio 50 se cerrará siguiendo el tipo cerrado. Si por el contrario el corte se hace un poco más allá de este disepimento y por tanto éste no es lesionado, la herida cicatrizará siguiendo el tipo abierto. Por todo ello, piensa que es posible que el modo de cierre de la herida esté únicamente determinado por un factor mecánico: la presencia o ausencia del último disepimento modificaría la presión ejercida por el líquido celómico sobre el tubo digestivo y paredes del cuerpo. Según este autor, la regeneración caudal pasa por ocho etapas de las cuales las dos últimas son comunes a las dos modalidades de cierre de la herida.

Los procesos histológicos que ocurren durante las etapas de la regeneración, siguiendo el tipo cerrado, son:

1º. Contracción del frente de sección, para disminuir



la superficie de la herida. Se movilizan los celomocitos y el tubo digestivo se retrae.

2º. Los celomocitos se acumulan en el frente de sección y forman un tapón cicatricial. Las células de la epidermis se deslizan por debajo de este tapón para formar el epitelio externo, y las células endodérmicas forman un epitelio interno. El cierre del tubo digestivo adopta forma de dedo de guante por la unión de los labios del intestino.

3º. Esta etapa se caracteriza por un espesamiento del tapón cicatricial. Entre los celomocitos aparecen sarcocitos procedentes de la musculatura parietal que ha sido dañada por el corte.

El epitelio externo secreta una nueva cutícula. En el extremo final de la cadena nerviosa aparecen nuevas fibras nerviosas que se dirigen hacia el tapón de la herida.

4º. En este momento la inervación del tapón cicatricial es mayor y también son más numerosos los capilares sanguíneos que lo irrigan. Un poco después comienza la histólisis de este tapón.

5º. Tiene lugar la destrucción del tapón cicatricial y aumentan las lagunas y charcos sanguíneos.

6º. En esta fase, el tapón cicatricial está casi totalmente reabsorbido. El proctodeo, muy corto, se invagina y se une con el tubo digestivo. Las células epiteliales se acumulan más en la cara ventral que

en la dorsal. Se forma así un pigidio constituido por un burlete ectodérmico abultado ventralmente. Por debajo de este epitelio, y ventralmente, se colocan células mesodérmicas ovoides, de núcleo voluminoso que contienen un grueso nucléolo.

Al final de esta etapa aparecen las primeras mitosis en el ectodermo.

Marcel concluye diciendo que cualquiera que sea el tipo de cierre de la herida, la duración de la regeneración caudal es la misma.

Pero los estudios realizados por Chapron (1970 a) sobre el determinismo de la regeneración caudal en Eisenia foetida, no incluyen las investigaciones ultraestructurales. Sin embargo, CHAPRON desde 1966 a 1971, BURKE (1974 a, b) y otros investigadores, han hecho un profundo estudio ultraestructural sobre la curación de la herida y regeneración cefálica en Eisenia.

Por las conexiones que, sin duda, tienen ambas regeneraciones (cefálica y caudal) vamos a mencionar brevemente cómo se produce la regeneración de los segmentos anteriores (JAMIESON, 1981).

En los Oligoquetos existe una metamería regular y cada segmento contiene una cavidad celómica limitada por una capa parietal o somatopleura, y una capa visceral o esplacnopleura y por septos transversos perforados por aberturas. La somatopleura está formada por células epiteliales y separada de la musculatura parietal por colágeno. La esplacnopleura está

formada por epitelio peritoneal visceral, la mayor parte del cual se diferencia como cloragocitos. El septo está compuesto de capas de colágeno al cual se adhieren fibras musculares y células peritoneales.

El vaso sanguíneo dorsal es un derivado peritoneal es pecial. La pared externa del vaso está cubierta por una delgada capa de colágeno a la que se pegan los cloragocitos. Las ramas del vaso dorsal irrigan la somatopleura y el septo, y alrededor de estas ramas no sólo hay cloragocitos sino también unas células pequeñas de citoplasma claro y gran núcleo que son hialoblastos que darán lugar a los hialocitos libres, que contienen vacuolas autofagas y fagosomas, y muestran actividad macrofagocítica. Ellos participan en la formación del tejido tegumentario de la herida (VALEMBOIS, 1971 a), es decir, de los dos tipos de células que forman la superficie del tapón cicatricial, el más numeroso es el de los hialocitos (CHAPRON y VALEMBOIS, 1969). Estos tienen un núcleo ovoideo bastante claro, con numerosas mitocondrias y un retículo endoplásmico muy desarrollado con anchas vesículas.

#### Tapón cicatricial:

Inmediatamente después de la amputación se forma un ta pón cicatricial de celomocitos y células somatopleurales. Este tapón cicatricial consta de una región superficial en continuidad con la musculatura parietal y la somatopleura, y de una región profunda que rodea al tubo digestivo, en el celoma.

La región superficial es la que asegura el cierre de la herida por inmigración de las células perivasculares de la somatopleura (hialocitos), células de la misma somatopleura, y quizás de los hemocitos (Cornec y Coulomb-Gay 1976). Sin embargo los elementos de esta región son expulsados al exterior a través de la nueva epidermis que se forma sobre el sustrato producido por ellos (CHAPRON, 1969 a, 1970 b, c). Para BURKE (1974 a, b) no existe esta expulsión al exterior de las células de la región superficial del tapón y no reconoce esta división del tapón cicatricial en capas superficial y profunda. Observa eleocitos en todo el tapón, y considera que el peritoneo parietal y el cloragógeno no contribuye apenas a la formación del tapón, el cual está formado casi exclusivamente de células celómicas libres (eleocitos y amebocitos).

De acuerdo con CHAPRON las células somatopleurales o perivasculares se convierten en células migratorias (hialocitos de VALEMBOIS). La célula se aplana y parece resbalar sobre la lámina basal del capilar. El núcleo se vuelve claro y se deforma, con un extremo ensanchado hacia adelante, emitiendo lateralmente cortos pseudópodos. Las mitocondrias se hinchan y el retículo endoplásmico rugoso se fragmenta. Antes de la expulsión hay un gran incremento de la concentración de fosfatasa ácida (CHAPRON, 1969 b, 1970 b, c).

La región profunda del tapón cicatricial se caracteriza por la acumulación de células ricas en ARN y lípidos, y lleva en el fluido celómico y sangre, eleocitos, células linfocitoides, macrófagos y hemocitos.

Bajo la estimulación nerviosa estas células profundas sufren histólisis, considerándose que juegan un papel nutritivo o trófico debido a los eleocitos que contienen.

1. b) Desdiferenciación:

Una vez cerrada la herida tiene lugar la desdiferenciación de los tejidos próximos a la superficie cortada. Estas células desdiferenciadas no vuelven a su estado de células embrionarias, sino que conservan su especificidad histológica, es decir, se simplifican morfológicamente, pero conservan su especificidad funcional (BALINSKY, 1965).

1. c) Blastema:

Antes de comenzar la destrucción o histólisis del tapón cicatricial, éste se cubre por las células que formarán la epidermis definitiva, el mesodermo y el endodermo. Estas células indiferenciadas son los blastocitos y son los que forman el verdadero blastema o yema de regeneración. Para unos está constituido por células de reserva indiferenciadas que emigran, mandadas por la herida, al lugar de regeneración, desde partes más o menos distantes del cuerpo, mediante movimientos ameboides o llevadas por la corriente sanguínea. Para otros, las células del blastema son de origen local, proceden de los tejidos adyacentes a la superficie de la herida, que se desdiferencian y se vuelven semejantes a los blastocitos que quedan latentes en el embrión.

Según CHAPRON (1971 a) la herida se cierra por dos capas: la primera es un epitelio superficial de origen ectodérmico que se convierte en la epidermis indiferenciada o epiblasto; una segunda capa formada por un epitelio interno endodérmico que dará origen al endoblasto. Las células del epiblasto, endoblasto y mioblasto (originados por la musculatura del lugar ) son los blastocitos descritos por Chapron (1969 a; 1970 b, c).

Los blastocitos tienen un núcleo bastante grande con un nucleolo muy denso y grande. El citoplasma es rico en mitocondrias y ribosomas libres, pero tienen un retículo endoplasmático granular pequeño.

Para CHAPRON (1969 a) el endodermo, músculo visceral y ectodermo se producen por blastocitos que proceden de la desdiferenciación de las capas correspondientes en el lugar de la amputación; aunque más tarde CHAPRON (1970 b, c) considera también que, al menos, el mesodermo, puede derivar de células indiferenciadas del animal intacto.

#### Origen de la epidermis, mesodermo y endodermo de la porción regenerada.

##### - Epidermis:

La epidermis con su cutícula cubre la superficie entera del cuerpo y reviste los poros dorsales, el estomodeo y el proctodeo, los folículos setíferos y la región distal de

las aberturas genitales y excretoras.

La cutícula es colágeno, es decir, está formada de capas de fibras colágenas. Estas fibras colágenas se apoyan en una matriz fibrilar y forman una epicutícula. La epicutícula y la matriz son polisacáridos neutros y ácidos.

El epitelio epidérmico consta de células de soporte, células basales y células secretoras. También incluye células sensoriales y terminaciones nerviosas.

Las células de la epidermis son continuamente reemplazadas por diferenciación de las células basales. Estas células basales son pequeñas, pero presentan un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollados donde se formará la secreción de las células glandulares.

Según CHAPRON (1969 a, 1970 b) después de la amputación la epidermis se extiende para cubrir la herida, y en esta epidermis provisional, las células glandulares, las células de soporte y la cutícula degeneran, pero las células basales persisten para formar el epitelio que dará origen a la nueva cutícula. VALEMBOIS (1971 b) también considera que las células basales son el origen de la nueva epidermis que se desarrolla sobre el órgano regenerado.

BURKE (1974 a, b, c) sin embargo cree que la epidermis definitiva se forma por extensión y multiplicación mitótica de las células columnares que dan origen a las células glandulares, y que las células basales no contribuyen a ello.

En cuanto a la membrana basal no hay ninguna indicación de que se forme por células migratorias; como no se forma has-

ta tres días después de la amputación, parece ser que es un producto de la nueva epidermis. (BURKE, 1974 a).

Las células de soporte o columnares forman un epitelio pseudoestratificado. Desde su superficie externa las microvellosidades atraviesan la cutícula. Los ápices de estas células contienen vesículas que se hacen más abundantes durante el cierre de la herida, cuando la cutícula está siendo rápidamente sintetizada. Es evidente que las vesículas están envueltas en la elaboración de la cutícula.

BURKE (1974 a) considera que las células columnares epidermicas son únicamente las responsables de la epitelización de la herida. Según este autor, los cambios en las células columnares de la epidermis durante la curación de la herida, son pocos. Hay una clara hipertrofia del retículo endoplásmico rugoso, un incremento local de ribosomas libres y aparición de lípidos, glucógeno y formaciones mielínicas. Estas acumulaciones son requeridas para los procesos regenerativos.

Las células basales. Su organización citoplasmática es similar a la de las células columnares pero el complejo de Golgi y las mitocondrias que, en las células columnares están apiladas, en las células basales están más uniformemente distribuidas. Están formadas por gránulos en forma de barras densas a los electrones y actúan como células de reemplazamiento en la epidermis normal, en la curación de la herida y en el tegumento del regenerado. Sin embargo BURKE (1974 b) cree que su función durante la cicatrización de la herida es sólo fagocítica, y que ellas no son epidérmicas sino homólogas a



a los celomocitos.

Las células glandulares epidérmicas. Parece ser que éstas no contribuyen a la epitelización de la herida (CHAPRON, 1970 d; HERLANT-MEEWIS y DELIGNE, 1965; VALEMBOIS, 1971 b). Estos autores consideran que las células glandulares derivan de células basales, mientras que BURKE (1974 a) considera que es más probable que sean las células de soporte quién las origine, ya que las células basales no hacen contacto con la cutícula como lo hacen las células glandulares y las de soporte, y además las células glandulares no tienen tampoco gránulos en forma de barra, característicos de las células basales.

- Mesodermo:

En los animales las células regenerativas mesodérmicas son: los neoblastos o células migratorias indiferenciadas (STEPHAN-DUBOIS, 1954, 1956; HERLANT-MEEWIS, 1945; BILELLO y POSTWALD, 1974); y los mioblastos o fibras musculares desdiferenciadas (THOUVENY 1967; CHAPRON, 1965, 1969 a, 1970 b, e, 1971 a; BILELLO y POSTWALD, 1974). También comprende células desdiferenciadas que se originan localmente de células peritoneales (BOILLY, 1969).

Al comienzo de la prerregeneración todas las células mesodérmicas, excepto las células musculares, participan en la formación del tapón cicatricial. Estas células mesodérmicas son: 1º. Células de tipo granulocítico, procedentes de células epidérmicas de la somatopleura, que pueden penetrar

en la musculatura (células conjuntivas), o en líquido celómico (granulocitos o amebocitos vacuolares); 2º. Células cloragógenas que son células peritoneales especializadas del intestino y vaso sanguíneo dorsal, cuya misión es almacenar glucógeno, lípidos; tienen una función trófica; 3º. Las verdaderas células migratorias, células claras y poco diferenciadas, que son los amebocitos, macrófagos y hemocitos. (CHAPRON, 1969 a).

El tapón cierra la herida, pero pronto degenera. Antes de que ocurra esta degeneración del tapón cicatricial, las células musculares próximas se desdiferencian, y forman los mioblastos que también pueden derivar de células conjuntivas que se desdiferencian. Estos mioblastos se rediferencian para forma las fibras musculares del regenerado (CHAPRON, 1969 a, 1970 b, e).

Los mioblastos indiferenciados son piriformes, con un gran núcleo de 6-7 micras de diámetro. Está situado en la parte basal que es más ancha. El nucléolo es claro y la región periférica es granular. El nucléolo es excéntrico y voluminoso. Abundan los ribosomas y hay algo de retículo endoplásmico rugoso en la célula. En la zona apical hay varios complejos de Golgi y numerosos microtúbulos estrechos. También son abundantes las mitocondrias, con gránulos densos en la matriz.

Al comienzo de la diferenciación, la región apical del mioblasto se extiende y crece formando un ángulo. El citoplasma nuevo que se forma es un hialoplasma claro con algunas mitocondrias y muchos ribosomas en roseta o esparcidos. Durante este período de diferenciación el nucléolo se aproxima a la membrana nuclear y se hace granular; hay un paso de material

nucleolar, y el nucleo disminuye de volumen. Aparecen los primeros miofilamentos en el nuevo citoplasma delante del núcleo, y se orientan en el eje longitudinal de la fibra muscular en desarrollo.

La fibra en diferenciación se alarga, las mitocondrias disminuyen en número y se dispersan, los miofilamentos se alargan también y engruesan. El retículo endoplásmico rugoso se dilata cuando la fibra joven se pone en contacto con otras células mesodérmicas o ectodérmicas (CHAPRON, 1970 e). Ello sugiere que la fibra joven está implicada en la síntesis del colágeno extracelular.

En cuanto a los neoblastos, SAYLES (1927), STONE (1932) y TURNER (1935) consideraban que los neoblastos eran pluripotentes y daban origen al mesodermo completo o a todo el mesodermo exceptuando los músculos circulares que se regeneraban del ectodermo (KRECKER, 1910). Sin embargo, BILELLO y POSTWALD, (1974) en sus trabajos sobre Ophidonaís serpentina consideran que la nueva musculatura de la pared del cuerpo se origina por desdiferenciación de los músculos antiguos y sugieren que los neoblastos pueden ser un conjunto de células peritoneales encargadas de regenerar los tejidos derivados del peritoneo en los animales amputados o de su reemplazamiento en los animales intactos.

Para unos autores, en la regeneración, los neoblastos, que se encuentran en el peritoneo, superficie posterior de los septos intersegmentarios, emigran hacia la herida, siguiendo el curso de la cadena nerviosa ventral y se acumulan debajo de la epidermis que cierra dicha herida, formando una ma-

sa ventral, en donde se observan células en división.

Ultraestructuralmente los neoblastos, en las lombrices no operadas, son células en forma de huso, con un gran nucleo lo que carece de zona central clara y con un núcleo que contiene acúmulos de cromatina. El retículo endoplásmico rugoso está disperso, pero abundan los ribosomas y las mitocondrias. El complejo de Golgi se observa raramente y no muestra signos de actividad secretora, pero se ven a veces centriolos y un cuerpo vesicular asociado con él.

Los neoblastos forman libres contactos con las células peritoneales subyacentes, las cuales se apoyan sobre la lámina basal o la musculatura de la cuerda nerviosa, o hacen directamente contacto con estas estructuras. Según CHAPRON, (1972) los polisacáridos liberados durante el período de lisis de las células cicatriciales de la herida, se fijarían sobre los blastocitos y harían perder a estas células la inhibición de contacto que les daría la facultad de despegarse y dividirse.

Cuando tiene lugar una amputación caudal, en el extremo de la cuerda nerviosa cortada, los neoblastos aparecen más grandes, quizás porque se vuelven redondos y el nucleolo adquiere una característica zona central clara (BILELLO y POSTWALD, 1974). El Golgi y el retículo endoplasmico rugoso aumentan.

Así pues, los neoblastos parece que forman únicamente los órganos mesodérmicos; la musculatura de la herida parece que tiene su origen en células musculares longitudinales desdiferenciadas; la cuerda nerviosa se forma aparentemente de células epidérmicas centrales y el tubo digestivo a partir de

la superficie cortada del antiguo intestino.

- Endodermo:

Las células endodérmicas del epitelio esofágico están relativamente indiferenciadas, y son ricas en ribosomas y mitocondrias, y estan bien irrigadas. Este epitelio carece de células basales y glandulares. Inmediatamente después de la amputación, el epitelio se despegas de su membrana basal, las células endodérmicas se agrandan y se vuelven blastocitos en dodérmicos (CHAPRON, 1969 a, 1970 b).

BURKE (1974 b) no reconoce los blastocitos endodérmicos y considera que el endodermo definitivo del regenerado procede del endodermo esofágico ligeramente alterado, del lugar de la herida. Ella considera que, después de la amputación, las células epiteliales del esófago desarrollan unas determinadas vesículas que sólo se ven en células de soporte epidérmicas.

CHAPRON (1971 a) ha hecho un detallado estudio ultraestructural acerca de la diferenciación del epitelio endoblástico (blastocitos endodermas). El epitelio del tubo endoblástico consta de una o dos capas de células orientadas como su núcleo, paralelas a la luz. El citoplasma es muy rico en ribosomas libres agrupados en rosetas. Hay algún retículo endoplásmico rugoso, pocas mitocondrias y algún glóbulo de lípido. Las células reposan sobre una rudimentaria membrana basal.

La primera indicación de la transformación del epitelio endoblástico en el epitelio de la faringe, es la desaparición de la membrana basal. Así las células se ponen en contacto directo con el mesodermo subyacente. Las células se alargan y estrechan y se disponen perpendicularmente a la luz. Aparecen microtúbulos. La formación de los cilios es precedidada por la desorganización de la cutícula, la reducción de la densidad del hialoplasma a los electrones, y la multiplicación de la mitocondria. Aparecen varios centriolos por célula.

Podemos resumir diciendo que, según CHAPRON después de una amputación anterior, las células basales de la epidermis, las células musculares y células conjuntivas, y las células endodérmicas del epitelio del esófago se desdiferencian, dando lugar respectivamente a los blastocitos ectoneurales, blastocitos musculares y blastocitos endodérmicos que luego se rediferenciarán para formar los nuevos tejidos del regenerado.

Durante la transformación del endotelio endoblástico en epitelio faríngeo, las neuronas toman sus posiciones. Estas células tienen un núcleo claro y rápidamente elaboran gránulos elementales. No se sabe si estas neuronas se originan de células endoblásticas o de células migratorias ectodérmicas.

Independientemente del origen de las células del blastema, mientras éste se está formando existe muy poca actividad mitótica en sus células. Sin embargo, una vez formado el blastema, se encuentran en él numerosas mitosis. Comienza el

3º período que es el de multiplicación celular que sigue inmediatamente a la formación del blastema. En un cierto tiempo las divisiones celulares superan al crecimiento, disminuyendo así el tamaño de las células del blastema. Después, el crecimiento se pone a la par con las mitosis, y se inicia un claro período de crecimiento, llegando a su máximo desarrollo inmediatamente después de formado el blastema, y luego disminuye progresivamente. Al disminuir el crecimiento comienza el 4º período de diferenciación celular.

## 2) Procesos fisiológicos.

Parece ser que el estímulo que determina la regeneración no es ni siquiera la propia herida, sino que lo que realmente importa es dañar los tejidos del órgano capaz de regenerarse. Se puede pensar, pues, que el daño de los tejidos es necesario para que se formen algunas sustancias en ellos, que son la causa de los procesos que vienen a continuación.

En una revisión realizada por BALINSKY (1965) en su "An introduction to Embriology" se considera que en los animales amputados la regeneración pasa por dos períodos: una primera fase catabólica, de destrucción celular y una segunda fase constructiva, de diferenciación celular. Durante la primera fase las células son destruidas y tiene lugar la desdiferenciación, que como se ha observado en las larvas de anfibios, se caracteriza por un incremento brusco de la actividad de las enzimas proteolíticas contenidas en los tejidos.

La principal enzima proteolítica es la catepsina cuya cantidad aumenta rápidamente en los primeros días de la amputación. También hay un rápido incremento de la actividad de las dipeptidasas.

Las enzimas proteolíticas destruyen las células dañadas por la operación, pero sobre todo intervienen en la desdiferenciación de parte de los tejidos adyacentes a la superficie de la herida. Durante esta desdiferenciación celular, existe una disminución de las proteínas en relación con la cantidad de material nuclear (ácidos nucleicos).

Como consecuencia de estos procesos catabólicos, las proteínas se destruyen y los aminoácidos libres aumentan hasta aproximadamente el doble de los que existen en los tejidos normales. También ocurre un cambio en la estructura de las proteínas y en sus productos, que se manifiesta en un aumento de la cantidad de compuestos con sulfidrilo reducidos.

Como consecuencia de la amputación, también se observa un cambio en la oxidación de los tejidos del muñon. El cociente respiratorio disminuye bruscamente, al mismo tiempo que se observa un aumento de ácido láctico en los tejidos en regeneración. Este aumento de ácido láctico sugiere una activa glucólisis y por tanto, bajos niveles de ATP y AMP. Las enzimas que en los tejidos normales realizan la oxidación, como la citocromo oxidasa, presentan un nivel bajo de actividad en los tejidos en regeneración.

Esta acumulación de aminoácidos libres, de ácido láctico y de grupos-SH libres durante las primeras fases de la regeneración tiene como consecuencia, una disminución del pH



de los tejidos del muñón y del blastema de regeneración.

La segunda fase de la regeneración es la fase constructiva, de diferenciación celular, cuyo metabolismo se caracteriza por un incremento de la oxidación, una vuelta al pH normal, un cociente respiratorio más alto, y por una disminución de los grupos-SH libres y de ácido láctico.

## II. Sistema nervioso.

Entre los factores que intervienen en la regeneración merece especial atención el sistema nervioso. Ya Schotte (1926), en sus trabajos sobre anfibios demostró que la presencia de fibras nerviosas en el nivel de la sección era necesaria para que la regeneración tuviera lugar, y que éstas son indispensables en el crecimiento del blastema y de la actividad mitótica.

Parece ser que el sistema nervioso sólo ejerce su influencia en las primeras fases de la regeneración: en los anfibios se ha comprobado que las primeras fases de la regeneración no se desarrollan si falta una inervación adecuada en la región de la herida, pero una vez que la extremidad en regeneración ha llegado a la fase en que se inicia la diferenciación, puede seguir su desarrollo aunque falte la inervación. El sistema nervioso aporta quizás factores mitógenos y sustancias que favorecen la síntesis de proteínas. (GRASSE, 1959).

En los Anélidos se observa muy claramente la influencia del sistema nervioso en la regeneración.

En estos animales el sistema nervioso ha ido evolucionando de tal manera que cada vez se hace más interno y mejor protegido, y llega en las especies mayores de Oligoquetos a situarse en el celoma. Un carácter de esa evolución es la centralización del sistema nervioso, adquiriendo dominancia los ganglios cerebrales y subfaríngeos.

El sistema nervioso es ganglionar y metamérico. Está

formado por un par de ganglios cerebroides o "cerebro", unidos mediante un collar perifaríngeo al primer par de ganglios de la cadena nerviosa ventral.

En el embrión, el cerebro se desarrolla en el prostomio. Esta posición prostómica se conserva en los Poliquetos, pero luego emigra hacia atrás junto con los conectivos y el ganglio subfaríngeo, en los Oligoquetos e Hirudíneos.

En los Oligoquetos, los ganglios cerebroides se encuentran situados en posición dorsal, en el tercer segmento anterior del cuerpo. Cada ganglio cerebroide emite dos gruesos nervios que inervan el prostomio.

Como consecuencia de la emigración del cerebro en el embrión, también los primeros ganglios de la cadena nerviosa ventral se apelotonan formando un grueso ganglio, el ganglio subfaríngeo, que se extiende ventralmente sobre la parte posterior del tercer segmento y la totalidad del cuarto segmento. Este ganglio adquiere el carácter de centro motor principal, subordinado a los ganglios cerebroides, pero dominando sobre los demás ganglios ventrales. Del ganglio subfaríngeo salen dos conectivos, uno por cada lado, que rodean la faringe y se unen al ganglio cerebroide formando el collar periesofágico.

En cuanto a la cadena nerviosa ventral, comienza en el quinto segmento hacia atrás, a partir del cual muestra una metamería regular, es decir, está formada por un par de ganglios por segmento. Estos ganglios son alargados, blanquecinos y están tan próximos uno a otro que parecen uno sólo. Cada par de ganglios está unido con el par anterior y posterior mediante comisuras.

De cada par de ganglios salen tres pares de nervios segmentarios: uno anterior aislado, y dos posteriores bastante próximos uno de otro. Estos nervios van a inervar los órganos contenidos en su segmento correspondiente.

En los ganglios se encuentran agrupados los cuerpos de las neuronas, mientras que los conectivos intersegmentarios contienen únicamente fibras nerviosas. GRASSE (1959).

El cerebro de los Anélidos está formado por un neuropilo central rodeado de una corteza de pericariones. A este neuropilo van a parar, tanto los axones que provienen de las células sensoriales del prostomio como los axones, quizás motores, que provienen del ganglio subfaríngeo y pasan hacia los nervios cerebrales. En el ganglio cerebral existen dos tipos de células: neuronas y células neurosecretoras.

Por su importancia en relación con nuestro trabajo hemos creído conveniente dedicarles un estudio más detallado a las neuronas neurosecretoras.

#### 1) Células neurosecretoras.

Las células neurosecretoras son de menor tamaño que las neuronas normales. Tienen un gran núcleo vesiculoso y un grueso nucleolo. Morfológicamente son similares a una neurona típica, pero difieren de ellas en que sus axones no inervan órganos efectores, tales como músculo, no hacen conexiones sinápticas con otras neuronas y fabrican materiales más o menos

abundantes en el cuerpo celular o pericarion, que se pueden poner de manifiesto por las coloraciones usuales de la neuro secreción tales como Azan, Gomori, Fucsina-Paraldehído, etc.

En la mayoría de los animales, la regulación del medio interno se realiza por la acción combinada del sistema nervioso y de las glándulas endocrinas que liberan hormonas de misión reguladora y acción prolongada sobre objetivos distantes de su lugar de origen.

Los mecanismos neuroendocrinos de los Invertebrados tienen una gran importancia. En los gusanos, no existe ninguna glándula especial endocrina, como el "corpora cardiaca" de los Insectos o la "glandula sinusal" de los Crustáceos. En los Oligoquetos la célula neurosecretora se puede considerar como un aparato endocrino. Ya SCHARRER (1937) había observado que en los ganglios del cerebro y cuerda dorsal de estos animales existían células neurosecretoras.

El sistema nervioso central de los Lumbrícidos está ricamente vascularizado. El cerebro está rodeado de una cápsula de tejido conjuntivo en la que circulan numerosos capilares que penetran profundamente y recorren, en todas direcciones, la capa celular periférica. De esta manera las células neurosecretoras se ponen en contacto con el sistema circulatorio. La neurosecreción, a través del conducto axonal, es liberada y ejerce su efecto biológico a cierta distancia, sobre el órgano efector.

En realidad, en el ganglio cerebral, la zona de almacenamiento se puede considerar como un tipo primitivo de com

plejo neurohemal, formado por la estrecha asociación de los terminales axonales neurosecretores con los capilares sanguíneos. También HERLANT-MEEWIS (1956) observó esa estrecha unión de las terminaciones neurosecretoras cargadas de granos de secreción con las paredes de los capilares sanguíneos, y considera que el neuropilo es un verdadero órgano neurohemal. Esta zona de almacenamiento puede ser comparada a los neuropilos neurosecretores de Poliquetos (BASKIN y GOLDING 1968; GOLDING y WHITTLE, 1974; ZAHID y GOLDING, 1975); a la glándula sinusal de Crustáceos (WEITZMANN, 1969) y al corpora cardiaca de Insectos (SCHARRER, 1968).

Sin embargo AROS (1974) y AROS, VIGH y TEICHMANN (1975, 1977), han demostrado que, si muchas células neurosecretoras son de un aparente tipo neurohemal, otras forman sinapsis axo-dendríticas, mientras que otros axones inervan órganos efectores, como las células de los músculos viscerales que rodean el ganglio cerebral.

Ultraestructuralmente se sabe que las partículas neurosecretadas son, en general, esferas densas a los electrones, entre 1000-3000 Å de diámetro, rodeadas de una delgada membrana. También las células neurosecretoras pueden producir vesículas claras a los electrones.

Según SCHARRER y BROWN (1961), en sus trabajos sobre Lumbricus terrestris, la síntesis del producto proteínico de neurosecreción se realiza sobre ribosomas asociados con el retículo endoplasmático. Después la síntesis prosigue en las vesículas del aparato de Golgi. Las membranas del Golgi forman la

membrana que rodea los gránulos elementales de neurosecreción, que más tarde invadirán el citoplasma, siendo eliminados a lo largo del axón. En los animales Invertebrados es probable que esta síntesis pueda también realizarse en el axón. El material sintetizado por las células neurosecretoras es mayormente proteínico, y es un portador para las hormonas.

Las células neurosecretoras proceden probablemente de células de reemplazamiento en respuesta a la estimulación por neuronas neurosecretoras..

Las células neurosecretoras han sido estudiadas por numerosos autores. No se sabe con certeza si los distintos tipos celulares morfológicos y tintoriales encontrados responden a diferentes estados funcionales de un único tipo de células, o a categorías celulares diversas. Sin embargo, parece ser que la mayoría de los investigadores coinciden en la existencia de varias clases de células neurosecretoras. A la luz del microscopio óptico se ha hecho una clasificación de células neurosecretoras atendiendo a su morfología y a sus propiedades tintoriales.

#### 1.a) Células neurosecretoras de los ganglios cerebroides.

Las células secretoras fueron primeramente observadas por SCHARRER (1937) que encuentra en la cara posterior y dorsal del cerebro de Anélidos un conjunto de células que se coloreaban diferentemente por el azan. Son las llamadas "células a" con citoplasma densamente cargado; "células b", azula

das, con citoplasma finamente granular; y "células c", carga gas con productos de secreción.

HUBL (1953-1956 a) distingue tres tipos de neuronas: "células a", rojas después de la coloración en el Azan; éstas "células a" no existen en el individuo joven y se diferencian progresivamente en la proximidad de la madurez sexual; para este autor, existe una correlación entre la actividad de las "células a" y la evolución de las gónadas. Las "células b" son de color gris azulado y menos numerosas que las anteriores. Están situadas más adelante, cerca del "pars intercerebralis". Son fusiformes y de secreción menos abundante y no tienen distintas afinidades tintoriales. Estas células, al contrario de las "células a" están siempre presentes, pero activan grandemente su secreción después de la amputación de la cola, al comienzo de la regeneración. Las "células c" con sidera que son semejantes a las "células b" pero de mayor tamaño (E. foetida; L. terrestris, A. terrestris f. longa). También estas células presentan una gran hipersecreción después de una amputación caudal (HUBL, 1956 a, b).

HERLANT-MEEWIS (1955) en el cerebro de Eisenia foetida encuentra varios tipos de células: "células a" situadas por detrás y en la superficie de los ganglios cerebroides. Su secretado es muy denso y corre a lo largo del axón hacia el neuropilo; "células b", estas células serían semejantes a las "células b" de HUBL, fusiformes, menos numerosas, localizadas lateralmente, cerca del racimo de conectivos anteriores, alguno de cuyos axones se dirigen hacia la comisura perifaríngea. También encuentra "gruesas y medianas neuronas",



con propiedades secretoras, pero en las que el axón no juega ningún papel en la evacuación de la secreción.

MICHON y ALAPHILIPPE (1959) reconocen cuatro tipos de células neurosecretoras en varias especies de Lumbrícidos (A. chlorotica, A. terrestris f. typica, A. rosea y Dendorbaena subrubicunda). Los tipos "a" y "b" se corresponden con los de los autores precedentes. También encuentran células que se corresponderían con las "grandes y medianas neuronas" de HERLANT-MEEWIS (1955).

Según BRANDENBURG (1956) y OTREMBA (1961), en Lumbricus, existen cinco tipos de células neurosecretoras, distinguiéndose unas de otras por su talla, sus afinidades tintoriales y la existencia de vacuolas en su citoplasma.

AROS y VIGH (1961 a), encuentran en el cerebro de L. rubellus dos tipos de elementos celulares:

- 1) Células pequeñas de citoplasma oscuro (asimilables a la "celulas a").
- 2) Grandes células claras. (Grandes neuronas).

Las células pequeñas están situadas en la región posterior de los ganglios y en posición superficial. Su secreción saldría por el axón hacia el neuropilo. Las células más grandes y claras, colocadas bajo las precedentes, están esencialmente localizadas en la región anterior de los ganglios cerebroides. Sus axones se dirigen hacia el ganglio subfaríngeo, bien siguiendo el conectivo subesofágico, bien atravesando el cerebro para tomar el conectivo opuesto.

AROS y VIGH estiman que todas las categorías celulares

distinguidas por los diversos investigadores están agrupadas en estos dos tipos que hemos descrito.

Más tarde AROS y cols. (1965) han puesto de manifiesto, en el cerebro de Lumbricus terrestris y de Eisenia foetida la existencia de dos tipos de células: "células A" y "células B", que, siguiendo a JAMIESON (1981), vamos a describir brevemente.

Las "células A" son a su vez de tres clases: A1, A2 y A3. Las "células A1" están situadas inmediatamente debajo de la cápsula cerebral. Son multipolares y forman la capa más superficial. Las "células A2" están situadas más profundamente y son unipolares. Sus prolongaciones, muy varicosas, pasan a la zona de almacenamiento entre la capa de neuronas. Las "células A3" forman dos grupos simétricos, a uno y otro lado del "pars intercerebralis". Son células bipolares; las prolongaciones centrales de cada célula bipolar penetran en la zona de almacenamiento, mientras que las prolongaciones periféricas convergen en un punto medio dorsal de la cápsula cerebral, y allí forman un grueso tronco nervioso que pasa desde el cerebro hasta el vaso medio dorsal.

Estos trabajos de AROS y cols. (1965) junto con las investigaciones histoquímicas de TEICHMANN, (1966) han puesto de manifiesto que las "células A" son estructural y químicamente típicas neuronas paptidérgicas que contienen una neurosecreción Gomori-positiva, con una proteína rica en grupos sulfidrilos (S-H) y disulfidos (S-S), (BIANCHI, 1963 a,b) y

carboxilos (COOH). Lo que sí parece demostrado es que las células que se tiñen de rojo con el Azan son idénticas a las células peptidérgicas Gomori-positivo (HERLANT-MEEWIS, 1955; HUBL, 1956 a).

Las "células B" son neuronas poco numerosas pero de gran tamaño, que están en contacto con el neuropilema, cuyas prolongaciones atraviesan también la zona de almacenamiento y entran en las comisuras. Estas "células B" no se tiñen con la fucsina-paraldehído.

También SAUSSEY (1966) encuentra en A. icterica las pequeñas células oscuras (asimilables a las "células a") cu yos axones moniliformes se dirigen hacia el neuropilo; y las grandes células claras (gruesas neuronas).

OOSAKI (1966) distingue en el ganglio cerebroide de E. foetida seis tipos de células neurosecretoras, de las cua les cuatro serían neurosecretoras en sentido estricto y las otras dos serían neuronas corrientes.

ZAHID (1977) en el cerebro de Allolobophora caliginosa y A. rosea observa tres tipos de células neurosecretoras: "ce lulas a", pequeñas y numerosas, con fuerte afinidad por la fucsina-paraldehído (PAF) y tionina-paraldehído (PAT); "cé lulas b", de tamaño grande y poco numerosas, con una modera da afinidad para colorearse con el PAF y con el PAT; por úl timo, células neurosecretoras de pequeño tamaño, fusiformes (probablemente se corresponden con las "células b" de HERLANT-MEEWIS, 1955) que son PAT y PAF negativo. También observa gran des y medianas neuronas colocadas más profundamente en el ce rebro.

Con el microscopio electrónico, PELLEGRINO DE IRALDI y DE ROBERTIS (1962) identifican cuatro tipos de neuronas neurosecretoras en el ganglio supraesofágico por la morfología y estructura del producto de neurosecreción, probablemente de tipo catecolaminérgico, con gránulos densos de 950 Å de diámetro.

GALLISSIAN y GIRARDIE (1972) en el Lumbrícido Eophila dollfusi (Tétary) hacen un estudio histológico y ultraestructural de las células nerviosas del cerebro y distinguen cinco tipos de células neurosecretoras que se diferencian por su posición, sus dimensiones, sus afinidades tintoriales y el tamaño de los gránulos de secreción.

En la parte posterior y latero-ventral de los ganglios cerebroides encuentran dos tipos celulares de tamaño bien diferente: células pequeñas, externas, piriformes, de núcleo redondeado y nucléolo bien visible, cuyos axones se meten entre las grandes células para alcanzar el neuropilema. Los citoplasmas se tiñen con la fucsina-paraldehído, o con azul alcian y con el azul de toluidina. Estas células se corresponderían con las células "tipo a" de HERLANT-MEEWIS (1955); grandes células, que ocupan una posición más interna. Están muy próximas al neuropilema. Tienen un núcleo esférico con un grueso nucléolo excéntrico. La presencia o ausencia de material ligeramente fucsínófilo permite distinguir dos categorías. También su citoplasma puede llevar inclusiones lipídicas. Estas grandes células serían comparables a las "gruesas y medianas neuronas" de HERLANT-MEEWIS (1955), o a las "gran

des células claras" de AROS y VIGH (1961 a).

El estudio ultraestructural les ha permitido distinguir tres clases de células pequeñas externas: las "células I" son muy fucsínófilas, encierran gránulos entre 1.700-1.900 Å de diámetro; las "células II" menos fucsínófilas que las anteriores, tienen gránulos de 1300-1500 Å de diámetro; y las "células III", no fucsínófilas, tienen gránulos entre 800-1000 Å; las "células IV" son células grandes, situadas más interiormente y tienen afinidad por la fucsina; sus gránulos miden de 1200-1400 Å; las "células V" no son fucsínófilas y tienen un número menor de gránulos, cuyo diámetro oscila entre 900-1000 Å. Todas estas células presentan numerosos aparatos de Golgi con gránulos densos.

HERLANT-MEEWIS (1975) con el microscopio electrónico confirma en Eisenia foetida jóvenes y maduras la existencia de tres tipos de células neurosecretoras.

FERRER DE MORAIS y cols. (1979) han encontrado cuatro tipos de células neurosecretoras peptidérgicas cerebrales también en Eisenia, que vamos a relacionar con células similares encontradas por otros autores tales como GALLISSIAN y GIRARDIE (1972); HERLANT-MEEWIS (1975); AROS y col. (1977) y otros.

- Células "tipo 1": Contienen gránulos densos a los electrones cuyo tamaño varía desde 1000 Å de diámetro en su origen, en el aparato de Golgi, a 4000 Å cuando están dispersas en el pericarion. Las mitocondrias presentan débiles líneas y abundan las cisternas de retículo endoplásmico rugoso

y ribosomas libres. En el pericarion hay rosetas de glucógeno y el Golgi es escaso y parece inactivo.

Los axones de estas células corren hacia el neuropilo a través de la zona de las células "tipo 2" y tienen grandes varicosidades en donde se acumula el glucógeno. Estos axones varicosos tienen pocos gránulos pero presentan grupos de neurofibrillas y algunos neurotúbulos esparcidos.

Estas células son multipolares, con muchas dendritas. Los gránulos densos redondeados o umbilicados se encuentran tanto en el pericarion como en las dendritas y más abundantes en el montecillo del axón.

Estas células "tipo 1" son semejantes a las células "tipo 2" de OOSAKI (1966) aunque éstas sólo tengan gránulos densos de 1000 Å de diámetro. También se pueden comparar con las células "tipo I" de GALLISSIAN y GIRARDIE (1972), cuyos gránulos miden 1700-1900 Å, y a las células "tipo 1" de HERANT-MEEWIS (1975).

También parecen ser homólogos con las células de almacenamiento (speicherzellen) de RÖHLICH y cols. (1962) del Lumbricus terrestris; con las células que poseen vesículas granulares de 1200-3500 Å descritas por MYHRBERG (1972) también en Lumbricus; y con las "células 1" de AROS y cols. (1965, 1977). En estas células las vesículas pueden predominar sobre los demás orgánulos, excepto el aparato de Golgi en el que se supone se forman. Estas vesículas pueden ser densas o pálidas a los electrones, y puede haber de ambas clases en el mismo pericarion. (MYHRBERG, 1972; AROS y cols. 1977).

Las células "tipo 1" contienen grupos S-H libres y pocos grupos S-S. Esto es asimilable con la pepsina, pero no con la tripsina. Estas células neurosecretoras cerebrales son las únicas presentes en los animales y se considera que regulan el crecimiento de los recién nacidos.

- Células "tipo 2": Son muy numerosas y grandes. Tienen una apariencia uniforme y abundan en la superficie dorsal del ganglio cerebral, extendiéndose lateral y posteriormente bajo las células de "tipo 1". Son piriformes.

Ultraestructuralmente las células "tipo 2" tienen gránulos pequeños de 1500 Å de diámetro como máximo (HERLANT-MEEWIS, 1975), aunque otros como FERRER DE MORAIS y cols. (1979) los consideran de un promedio entre 1800-2000 Å con mitocondria oblonga menor que las de las células de "tipo 1". El núcleo contiene grumos pequeños de cromatina dispersos. Aunque estas células son claramente secretoras, pueden estar momentáneamente inactivas, y entonces presentan los gránulos agrupados en áreas ricas en retículo endoplásmico rugoso, con cisternas de líneas paralelas, ribosomas libres y polisomas. El tamaño del nucléolo varía con la actividad celular. La mitocondria es más grande que las de las células de "tipo 1", pero alguna sufre lisis y por ello existen autofagosomas. Los pequeños cuerpos de Golgi aparecen inactivos.

Otras células recomienzan su actividad secretora y entonces el Golgi se hace voluminoso, con cisternas llenas de material denso y libera pequeños gránulos umbilicados, que

se hacen más grandes en el citoplasma, amontonándose en la periferia donde los neurotúbulos y neurofibrillas se ven también mejor. En el Golgi se ven cuerpos mielínicos y la mitocondrias se observan en las proximidades de este complejo.

Las células "tipo 2" se vuelven activas en la pubertad y permanecen activas durante la reproducción. Estas células parecen tener un importante papel y se encuentran en el ganglio cerebral de todos los Oligoquetos.

El material neurosecretado se tiñe con la fucsina-paraldehído (PAF positivo) y por el método del azul alcian después de la oxidación (modificación de ADANS y SLOPER); es rico en grupos disulfidos (S-S) y tienen una pequeña cantidad de grupos sulfidrilos (S-H), además de tirosina y de triptófano. Estas células "tipo 2" se corresponderían con las "células a" de HUBL (1956 a, b). Estas células que, como dicen, aparecen en la pubertad decrecen su secreción si las gónadas son extirpadas; esta secreción parece ser necesaria para una espermatogénesis normal.

También parece que estas células "tipo 2" de Eisenia son homólogas con aquellas descritas por PELLEGRINO DE IRALDI y DE ROBERTIS (1962), con vesículas granulares de 1500 Å de diámetro; con las de ROHLICH y cols. (1962) de un tamaño de 1300 Å; con las de PETZOLD (1963) en L. terrestris, de 900-1800 Å. También parecen equivalentes a las "células A2" de AROS y cols. (1965) y TEICHMANN y cols. (1966); con las células "tipo 3" de OOSAKI (1966), cuyos gránulos tienen un tamaño de 500-1000 Å; y a las células "tipo II" de GALLISIAN



gránulos se destacan y se agrandan y toman la apariencia de esferas que contienen un material pálido y finamente granular, rodeados de una clara zona y limitadas con una estrecha y densa membrana.

Durante la actividad, las células aumentan en número y volumen. Los gránulos aumentan de 1300 a 1500 Å de diámetro y la clara zona exterior desaparece (FERRER DE MORAIS y cols., 1979).

Cuando está próxima la madurez sexual, las células se hacen enormes. Sus gránulos miden de 2500-3000 Å, pero apenas si sufren cambios. Los gránulos progresivamente llenan el citoplasma, dejando solamente alguna aislada cisterna de ergastoplasma y unos pocos ribosomas y lisosomas entre ellas.

La mayor parte de las mitocondrias sufren lisis. El Golgi es pequeño e inactivo. El montecillo de axón es ocupado por un gran núcleo de contorno sinuoso y provisto de bloques de cromatina y de un gran núcleo. Los gránulos, a través del axón, llegan al neuropilo. Allí hay numerosas sinapsis entre los axones neurosecretores y las prolongaciones de las neuronas no-neurosecretoras. Estos contactos se caracterizan por su clara apariencia y por la presencia de muchos neurotúbulos (FERRER DE MORAIS y cols. 1979).

Estas células fueron descubiertas por OOSAKI (1966) que les dio el nombre de células "tipo 1", aunque no menciona la edad de las lombrices donde fueron observadas. Sus gránulos son moderadamente densos a los electrones y de un tamaño entre 2000-3000 Å de diámetro.

También se pueden corresponder con las "células Q" de GERSCH y UDE (1967) de Enchytraeus. Los gránulos de estas células miden de 1100-2500 Å y tienen un ergastoplasma muy rico en ribosomas y lisosomas. Las formaciones del Golgi son pequeñas. Este autor piensa que las gotitas de secreción son de origen golgiano. Sin embargo las "células Q" parece que influyen en la regeneración.

Igualmente las células "tipo III" de PETZOLD (1963) que carecen de gránulos y tienen algunas vesículas con material denso a los electrones y con dilatadas cisternas de ergastoplasma, pueden ser las células "tipo 3" de HERLANT-MEEWIS, (1975) y las "células A" descritas en Amyntas por TAKEUCHI (1967, 1968 a, b), los cuales solamente encontró en animales maduros.

- Células "tipo 4": Estas células no han sido descritas por HERLANT-MEEWIS (1975). Aparecen solamente cuando la puesta de los huevos y se llaman "células de gestación". Su actividad cesa por inanición y cuando la producción de los capullos; son escasas y están situadas en la región latero-ventral del cerebro.

Su ciclo es semejante al de las células "tipo 2". En el comienzo de la secreción aparecen grandes y activos cuerpos de Golgi que dan origen a pequeños, redondos, densos y umbilicados gránulos de 750 Å de diámetro. Las cisternas de retículo endoplásmico rugoso ocupan totalmente el pericarion y las mitocondrias son muy numerosas. La característica prin

principal es la presencia en todo el pericarion de dilatadas cisternas que contienen material denso con sólo unos pocos ribosomas. Dispersos por toda la célula, los gránulos alcanzan un promedio de 1500-2000 Å; unos permanecen densos, otros, los más grandes, se vuelven mucho más pálidos y desarrollan un contenido fibrilar. Los gránulos maduros desplazan a los orgánulos hacia el límite de la célula, donde se encuentran vestigios de cisternas dilatadas y numerosos lisosomas y autofagosomas que contienen pequeños gránulos en destrucción.

Estas células "tipo 4" son semejantes a las descritas por DE VRIES-SCHOUMACKER (1976) en los ganglios ventrales de los segmentos genitales de Eisenia foetida. También se pueden asimilar a las células "tipo IV" de GALLISSIAN y GIRARDIE (1972).

Por último, también en el ganglio cerebral se encuentran algunas células aminérgicas. Son relativamente escasas, con gránulos de núcleo denso de 700-1200 Å de diámetro, fluorescentes. Son las neuronas catecolaminérgicas del cerebro de Lumbricus. Estas células llamadas "grandes células granulares aminérgicas" parecen ser distintas de las pequeñas neuronas granuladas monoaminérgicas de MYHRBER (1972).

Las neuronas ordinarias cerebrales que OOSAKI (1966) describe como células de "tipo 5" y "tipo 6" en el ganglio cerebral de Eisenia parece que son identificables con neuronas aminérgicas.

También PELLEGRINO DE IRALDI y DE ROBERTIS (1962) han descrito células aminérgicas en el cerebro de Lumbricus con

gránulos de núcleo denso de 950 Å. Los gránulos parecen producirse de la vesículas del Golgi que está bien desarrollado.

En resumen, en el cerebro de las lombrices recién nacidos solamente se han encontrado células de "tipo 1". En el adulto, abundan las células de "tipo 1" y "tipo 2". Estas últimas aparecen en el momento de la pubertad, se activan fuertemente, y parece ser que juegan un papel muy importante en la espermatogénesis. Las células de "tipo 3" son las "células de la pubertad" y las células de "tipo 4" son las "células de gestación" y solo aparecen durante la puesta.

También en el Oligoqueto Enchytraeus albidus se ha hecho un estudio histológico y ultraestructural bastante detallado. DEUSE-ZIMMERMANN, (1960), YGERSCH y WOHLRABE, (1965) observan dos tipos de células neurosecretoras cerebrales: las "células P" en número de cuatro situadas a cada lado en la porción posterior del cerebro, y la "célula Q" más grande, detrás de las anteriores. Hay además neuronas ordinarias y las llamadas "células M" con gran cantidad de abultadas mitocondrias. En el ganglio subesofágico encuentran un par de "células U", neurosecretoras, situadas en la parte posterior.

El estudio ultraestructural ha sido realizado principalmente por GERSCH y UDE (1967, 1971); UDE y GERSCH (1968) y GOLDING y WHITTLE (1975).

Las "células Q" presentan una gran cantidad de gránulos concentrados en el polo opuesto al axón. En la loma de este axón aparece un complejo retículo endoplásmico rugoso

muy desarrollado y con unas dobles membranas separadas por 750-1500 Å y asociadas con ribosomas. El núcleo está situado en medio y, muy próximo a él, se encuentra el aparato de Golgi. Los gránulos tienen un tamaño entre 1100-2500 Å, aunque lo más corriente es de 1400 Å. Hay algunas mitocondrias dispersas así como lisosomas. Las células gliales que rodean a las "células Q" producen invaginaciones de la membrana celular, sobre todo en la zona donde se acumulan los gránulos.

Estas "células Q" parece ser que están implicadas en la regeneración caudal. Después de una amputación, las "células Q" liberan su secreción, y tanto esta fase de liberación como la que sigue de restablecimiento de secreción, se caracterizan por un extraordinario desarrollo del retículo endoplásmico rugoso con ensanchamiento de las cisternas. Los ribosomas aumentan en la fase de almacenamiento. Unos quedan libres en el citoplasma en grupos de tres o cinco y otros que dan en las membranas del ergastoplasma.

Las "células M" están relacionadas con los ciclos de las "células Q". Las mitocondrias de las "células M" de animales normales tienen crestas paralelas, mientras que las de los animales amputados tienen las crestas extraordinariamente desordenadas. Estas células se reconocen fácilmente por sus grandes mitocondrias y grandes vacuolas que pueden tener un contenido denso a los electrones.

Las "células P" tienen unos gránulos mucho más pequeños y menos densos a los electrones que los de las "células Q". Su tamaño es de unos 1100 Å. Carecen de retículo endoplásmico.

mico rugoso. Entre los gránulos aparecen mitocondrias bastante pequeñas. Los complejos de Golgi son numerosos y bien desarrollados, pero las laminillas son más estrechas y cerradas que los de las "células Q".

1.b) Células neurosecretoras del ganglio subfaríngeo.

En un estudio histológico del ganglio subfaríngeo HUBL (1956 a, b), en el género Lumbricus, había encontrado células neurosecretoras a las que llama "células U", comparables a las "células d" de HERLANT-MEEWIS (1955). Estas células son todas homogéneas y tienen unas propiedades tintoriales características. (TEICHMANN y cols., 1966; TEICHMANN y GOSLAR, 1968; VIGH, TEICHMANN y GOSLAR, 1969). Las células descritas por DEY y NANDA (1975) en Pheretima posthuma son también semejantes a las "células U" (GOLDING y WHITTLE, 1977).

HERLANT-MEEWIS (1962 a) también demostró la existencia de grandes células neurosecretoras en el ganglio subfaríngeo de Eisenia foetida. Observa que éstas "células U" se diferencian después de comenzar la gametogénesis. (HERLANT MEEWIS, 1966 a).

MICHON y ALAPHILIPPE (1959) encuentran en el ganglio subfaríngeo de A. chlorotica células de tipo a, b y d. Para AROS y VIGH y TEICHMANN (1965) las células neurosecretoras subfaríngeas son las mismas que las pequeñas células oscuras y grandes células claras del cerebro de Lumbricus. SAUSSEY

(1966) también es de la misma opinión en su estudio de A. chlorotica.

DOGRA (1968) también encuentra en el ganglio subfaríngeo de Pheretima posthuma otras células con propiedades histoquímicas características, y supone, al igual que HERLANT-MEEWIS, que las "células U" están implicadas en el ciclo anual.

ZAHID (1977) observa la presencia de "células c y d" en el ganglio subfaríngeo de A. caliginosa y A. rosea. Estas células tienen un pericarion pequeño. También estas células aparecen en la cadena nerviosa ventral. Las "células c" presentan prolongaciones citoplásmicas y tienen de moderada a fuerte reacción por la fucsina-paraldehído y por la tionina-paraldehído. También encuentra otro tipo de neurona, las "células e" que sólo están presentes en el ganglio subfaríngeo con pericarion grande y fuerte afinidad por el PAF y PAT.

Estructuralmente las células subfaríngeas han sido investigadas por AROS, VIGH y VIGH-TEICHMANN (1975) en el género Lumbricus. Según estos autores las células neurosecretoras subfaríngeas además de secretar sus neurohormonas en los vasos sanguíneos, pueden dar origen a sinapsis peptidérgicas con terminaciones nerviosas.

#### 1.c) Células neurosecretoras de la cadena nerviosa ventral.

Tanto en los Poliquetos como en los Oligoquetos, las células neurosecretoras de la cadena nerviosa muestran una característica ordenación en cada ganglio segmentario.

De VRIES-SCHOUMACKER (1976), ha hecho un estudio muy detallado de estas células en Eisenia foetida que vamos a resumir brevemente (JAMIESON, 1981).

Las células que se observan al microscopio óptico son las llamadas C1, C2, C3, C4, CM, CC, CV1, CV2, CV3, CV4, CP1 y CP2. En el estudio ultraestructural ha reconocido las mismas células que observó HERLANT-MEEWIS (1966 b) a la luz del microscopio óptico.

Las células C1, C2 y C3 son muy fucsínófilas y se tiñen vivamente con el azul alcian después de la oxidación. Están presentes en todos los ganglios de la cadena nerviosa y parece ser que tienen una función en el metabolismo general. Las "células C4" son débilmente fucsínófilas y se tiñen de color azul turquesa con el azul alcian después de la oxidación. Sólo se encuentran en el ganglio de los segmentos genitales y están envueltas en el ciclo sexual de los gusanos. No son fluorescentes y su secreción es peptidérgica (KNOWLES, 1965; DE VRIES-SCHOUMACKER, 1977, 1978). Sus glánulos se tiñen fuertemente con el azul de toluidina. Son esféricas y unas tienen un contenido finamente granular y otras son densas a los electrones. Entre los gránulos se dispone el ergastoplasma. En la fase de almacenamiento hay muchos gránulos pálidos de 1800 Å, lisosomas y cisternas de retículo endoplásmico rugoso. En la fase activa los polisomas son muy numerosos sobre el retículo endoplásmico rugoso, con gránulos de 1500 Å y con un Golgi muy activo. Hay pequeñas mitocondrias dispersas en el pericarion siendo más numerosas en la periferia y alrededor de



los complejos de Golgi. Estas células C4 son muy activas cuando la puesta de los huevos. Parecen ser homólogas a ciertas células del cerebro de Enchytraeus descritas por GERSCH y UDE (1967); también parece corresponderse con las "tipo IV" del cerebro de Eophila de GALLISSIAN y GIRARDIE (1972) y con las células "tipo 4" del cerebro de Eisenia foetida de HERLANT-MEEWIS (1975) y FERRER DE MORAIS (1979).

Las "células CM" también están restringidas a los ganglios de los segmentos genitales en cada uno de los cuales hay sólo un par. Sólo aparecen desde la pubertad. Son debilmente fucsínófilas, no son fluorescentes y su secreción es peptidérgica como la de las "C4". El retículo endoplásmico rugoso presenta dilatadas cisternas. El Golgi es muy numeroso y las mitocondrias abundan cerca de él. Los gránulos muy uniformes, tienen un tamaño de 1800 Å. La actividad de estas células aumentan durante la puesta.

Parecen ser homólogas con las células de dilatado ergastoplasma observadas por RÖHLICH y cols. (1962) en el cerebro de Lumbricus.

Las "células CC" son las células cromófilas. Aparecen en todos los ganglios de la cadena ventral. No son fucsínófilas y se tiñen diferentemente con el azul alcian después de la oxidación, unas de color rojo brillante y otras de color violeta.

Ultraestructuralmente presentan unos gránulos esféricos densos a los electrones, de 200 Å de diámetro, con un contenido homogéneo. Entre los gránulos hay ribosomas. El retí-

culo endoplásmico rugoso está en la periferia y alrededor del núcleo. El Golgi está poco desarrollado. La mitocondria aparece esparcida entre los gránulos. Estas células cromafines tienen gránulos no umbilicados de dos clases: unos de 2000 Å y otros de 700 Å, más densos a los electrones.

Las "células CV1" están situadas en la parte media ventral y posterior en la región de las células cromófilas (CC) y se tiñen pálidamente con el azul alcian después de la oxidación. Presentan gránulos esféricos de núcleo denso y tienen un tamaño de 800 Å. Entre estos gránulos aparecen otros pequeños, seguramente de glucógeno. El Golgi muy activo, se agrupa alrededor del núcleo. Las mitocondrias están dispersas y los ribosomas libres. A veces hay lisosomas.

Las "células CV2" son un par de células situadas en la región media de cada ganglio. Presentan un citoplasma denso con vacuolas. Los gránulos densos de forma y tamaño variable y, entre ellos, hay gránulos de glucógeno. Alrededor del núcleo se sitúan los aparatos de Golgi y las mitocondrias.

Las "células CV3" son un par situadas en la base del segundo par de nervios. Presentan una catacolaminérgica fluorescencia verde y su función es incierta. Sus gránulos, muy abundantes, de 1500 Å, tienen un núcleo denso y ribosomas libres y polisomas. El Golgi es inactivo.

Las "Células CV4" están situadas entre las C4 y no se tiñen ni con la fucsina, ni con la floxina, ni con el azul alcian después de la oxidación. Sus gránulos alargados e irregulares tienen de 1000 a 2000 Å de diámetro. Su núcleo es den-

so; entre ellos hay gránulos de glucógeno.

Las CV1, CV2 y CV4 muestran reacción cromafin positiva por la noradrenalina y fluorescencia amarilla característica de las indolominas (serotonina), es decir, son células secretoras con secreción aminérgica. Las CV3 y las CC sólo muestran reacción positiva para el método fluorescente y se consideran motoneuronas o interneuronas. Las CP1 y CP2 son muy floxinófilas.

## 2) Control de la regeneración.- Neurohormonas.

Un importante papel en el control de la regeneración parece ser atribuido a factores producidos por células neurosecretoras del sistema nervioso central de los Anélidos. Estos factores producidos por neuronas parece que son los que inducen a las células a desdiferenciarse y a acumularse bajo la epidermis, provocan las nuevas mitosis y determinan el fin de la multiplicación celular y el comienzo de la diferenciación.

Los estudios histoquímicos y enzimológicos han permitido identificar con gran precisión estas neurosecreciones. En el ganglio cerebral de los Lumbricidos se sabe que hay dos grupos de sustancias, péptidos y aminos, que son secretados por unas células a las que KNOWLES y BERN (1966) llaman, respectivamente, células peptidérgicas (células A) y células aminérgicas (células B).

La naturaleza peptidérgica de algunas neuronas ha sido puesta de manifiesto por BIANCHI (1963 a, b,) en algunos Lumbricidos. Este autor divide las células neurosecretoras del cerebro y ganglio subfaríngeo de Enchytraeus albidus, en células que secretan proteínas y células que secretan lípidos. (Bianchi, 1974).

También han investigado las neurosecreciones peptidérgicas TAKEUCHI (1965 a, b) y TEICHMANN y cols. (1966). El ciclo secretor ha sido demostrado por el estudio autorradiográfico de la incorporación de cisteína y metionina marcadas dentro del sistema neurosecretor de Eisenia foetida y Lumbricus herculeus (Tork y cols. 1966).

En cuanto a las neuro hormonas aminérgicas en los Oligoquetos, DURCHON y JOLY (1978) y TABAN y cols. (1978) han demostrado la presencia de las catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina) y serotonina (5-HT). También han investigado la actividad fisiológica de las sustancias aminérgicas en los Oligoquetos, autores tales como FLOREY (1967), ITO y cols. (1971).

Parece ser que las neuronas monoaminérgicas que producen dopamina, noradrenalina y serotonina son las mismas células que se tiñen de color azul con el Azan en el ganglio cerebral de Lumbricus. En los trabajos llevados a cabo por HUBL (1956 b) y CHAPRON (1972) se ha demostrado la presencia de dopamina en las células neurosecretoras de la cuerda nerviosa de Eisenia y se ha comprobado que esta neurosecreción juega un importante papel en la regeneración caudal. Los análisis

sis microespectrofluorescentes demuestran que la dopamina aparece en un tipo de neuronas; otras contienen dopamina y noradrenalina. También DE VRIES-SCHOUMACKER (1974) ha demostrado en Eisenia foetida la naturaleza aminérgica de las neurosecreciones de las células de la cadena nerviosa ventral.

Se ha observado que en los animales inferiores como Anélidos y Moluscos, la amina más abundante es la serotonina, y que ésta abunda más en la cuerda nerviosa ventral que en el ganglio cerebral. La adrenalina parece escasa. La noradrenalina se encuentra mayormente en el ganglio cerebral (WELSH y MOORHEAD, 1960; HERLANT-MEEWIS, 1977).

Recientemente ROBERTSON Y OSBORNE (1979) han confirmado la presencia, en el sistema nervioso de Lumbricus terrestris, en la cuerda nerviosa ventral, de serotonina, octopamina, dopamina y noradrenalina.

El reconocimiento de estas aminas biógenas se ha hecho con el método histofluorescente de FALCK y HILLARP (1962). Este método da fluorescencia amarilla para la serotonina y verde para las catecolaminas.

También las técnicas inmunocitológicas han revelado la presencia de los polipéptidos ACTH y sustancia P en las células "tipo A", y ACTH en las células "tipo B" del cerebro de Lumbricus terrestris (AROS y cols. 1980).

Estas dos sustancias además se han encontrado en el ganglio subfaríngeo. Según AROS y cols. (1980) la sustancia P puede jugar un papel en la peptidérgica transmisión sináptica en el tejido nervioso de invertebrados.

Las neurohormonas que intervienen en la regeneración son variadas y difíciles de identificar. En los vertebrados se ha demostrado que la mayor parte de las hormonas actúan a nivel de la membrana celular, por intermedio del sistema adenilato ciclasa (AC), que cataliza la transformación del ATP en AMP cíclico. Este nucleótido activará los enzimas celulares. Como el sistema adenilato ciclasa es uno de los principales mecanismos receptores, el estudio de este sistema durante la regeneración, será un medio de identificación de las neurohormonas que intervienen y ayudará a comprender mejor como actúa el sistema nervioso. También hay que tener en cuenta que, la adenilato ciclasa no es la única enzima de membrana, y que las neurohormonas peptidérgicas pueden actuar sobre el metabolismo celular por una vía diferente.

Son muchas las hormonas que actúan por intermedio del sistema adenilato ciclasa. Para una célula determinada sólo actúan ciertas hormonas y la respuesta biológica depende de la especialización funcional de la célula, y en particular del sistema sensible al AMPc. Los receptores de membrana son de varias clases. A cada clase corresponden efectores agonistas y antagonistas específicos.

El estudio citoquímico de la adenilato ciclasa muestra que la actividad ciclásica es más importante en los animales en regeneración que en los no amputados.

Al lado del sistema adenilato ciclásico existen otros sistemas menos conocidos, la guanilato ciclasa (GMP), que ca

taliza la formación de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) y la citidilato ciclasa (CMP), que cataliza la formación del citosín monofosfato cíclico (CMPc).

Los receptores de membrana pueden acoplarse a estas enzimas. Así por ejemplo en lo que concierne a la guanilato ciclasa, NESTLER y cols. (1978) y KEELY y LINCOLN (1978) han observado que una estimulación nicoticolinérgica aumenta el nivel de GMPc intracelular en los vertebrados.

FRANQUINET y COULON (1980) demuestran como las variaciones de nivel de GMPc juegan un papel en el curso de la regeneración.

Los efectos del AMPc durante la regeneración son los siguientes: el AMPc en asociación con la GMPc interviene, por una parte, en la síntesis de ADN y la proliferación celular, y de otra parte, actúa en la síntesis del ARN y de las proteínas citoplasmáticas y nucleares (FRANQUINET y COULON, 1980).

También FAUSTO y BUTCHER (1976) son de la opinión de que el nivel intracelular de los nucleótidos cíclicos controlaría la síntesis de ADN y la división celular.

Tanto en animales vertebrados como en invertebrados, parece haberse demostrado que las hormonas peptidérgicas y hormonas aminérgicas pueden interactuar entre ellas.

Según FRANQUINET y COULON (1980) en las planarias existe un complejo control en la regeneración en donde intervienen hormonas de estas dos clases. Lo mismo se cree que ocurre en el Poliqueto Platinereis dumerilii (HOFFMANN, 1976) donde parece que el cerebro tiene, durante la regeneración, una ac-

tividad aminérgica inversa a la actividad hormonal peptídica. También en el Anélido Poliqueto Owenia fusiformis las hormonas aminérgicas, serotonina y noradrenalina están presentes a nivel de la cadena nerviosa ventral (COULON y BESSONE, 1979) donde ha sido puesta en evidencia con la ayuda de recaptación de serotonina y noradrenalina marcadas.

FRANQUINET y COULON (1980) llegan a la conclusión de que en los animales en regeneración la adenilato ciclase está localizada sobre la membrana plasmática, sobre todo en aquellas células en vías de dediferenciación, y que en Owenia fusiformis, las neuronas aminérgicas y/o peptidérgicas están implicadas en la activación de la adenilato ciclase. Consideran también que el nivel de AMP cíclico en las células varía en el curso de las diferentes fases del ciclo celular, siendo muy débil en la fase proliferativa durante la mitosis, y aumentando grandemente el nivel durante la diferenciación celular.

ZACCHELO y col. (1972) en fibroblasto humano, y MACKMAN (1971) en el ratón también observan que el nivel de AMP cíclico aumenta cuando las células entran en contacto; para FRANQUINET y COULON (1980) sería precisamente la fase de diferenciación, el período cuando las células se ponen en contacto unas con otras.

MANSOUR y cols. (1960) y LE MOIGNE y cols. (1976) han demostrado en las planarias cómo la síntesis del AMP cíclico por la adenilato ciclase está estimulada por mediadores químicos tales como la dopamina o la serotonina.



En cuanto a la regeneración en Oligoquetos se ha visto en Eisenia foetida que la dopamina (hormona aminérgica) y el dibutiril AMPc provocan la destrucción del tapón cicatricial (CHAPRON, 1972), que permite continuar la regeneración; la dopamina actuaría por medio del AMP cíclico liberando polisacáridos ácidos.

También HERLANT-MEEWIS (1977), HERLANT-MEEWIS y cols. (1980) han observado en el sistema nervioso de Eisenia foetida células aminérgicas y peptidérgicas. Todas las células de tipo peptidérgico van acompañadas de otras células aminérgicas que encierran gránulos mucho más pequeños, que se iluminan por las técnicas de fluorescencia por las que se reconocen las distintas aminas (catecolaminas y serotonina).

### III. Influencia de los centros nerviosos en la regeneración caudal.

#### A) Papel de los ganglios cerebroides.

Son muchos los trabajos que se han realizado en los Anélidos para ver qué influencia ejercen los ganglios cerebrales sobre la regeneración caudal.

En Poliquetos, CASANOVA (1955), en la especie Platyneis massiliensis comprueba que la extirpación del prostomio lleva consigo una casi paralización de los procesos regenerativos caudales. DURCHON (1956) demostró en Perinereis cultrifera y Nereis costae que la neurosecreción cerebral ejercía una acción estimuladora sobre la regeneración de los últimos segmentos amputados.

CLARK Y CLARK (1959); CLARK y BONNEY (1960) y CLARK y EVANS (1961) comprueban en Nereis diversicolor que el ganglio supraesofágico juega un importante papel en la regeneración posterior. Observan que es indispensable durante las fases iniciales de la regeneración caudal, aunque ellos apuntan que "una vez comenzada la regeneración, la importancia del cerebro disminuye". En sus experimentos llegan a la conclusión de que si se extirpa el ganglio supraesofágico antes de la amputación caudal, se impide la formación de un regenerado; si la extirpación del ganglio cerebral es tres días después de la amputación caudal, se retarda, pero no se impide, la formación de nuevos segmentos caudales.

HAUENSCHILD (1960 a) en *Platynereis dumerilii*, también comprueba que a los individuos que han sufrido extirpación del cerebro y amputación de la cola son incapaces de regenerar.

DURCHON y MARCEL (1962) en sus experimentos sobre *Nereis diversicolor* observan la acción indispensable del cerebro en la formación del regenerado posterior y señalan que "el principio activo de naturaleza hormonal es secretado en las horas que siguen inmediatamente a una amputación posterior y es indispensable para la activación de las células de regeneración".

HAUENSCHILD (1963) implanta una porción de prostomio en el celoma de *Platyeneis dumerilii* descerebrados y amputados posteriormente comprueba que hay regeneración caudal.

GOLDING (1967 a, b, c y d) en sus investigaciones sobre *Nereis* observa también la existencia de una hormona en el prostomio que controla la regeneración caudal e indica que esta hormona tiene un efecto prolongado, más bien a la manera de una hormona de crecimiento.

Más tarde BOILLY (1974), GOLDING (1974) y OLIVE (1974) constatan la presencia de la hormona de regeneración en el prostomio de los Nereidos, aunque también observan que esta hormona no interviene en la curación de la herida ni en la formación del pigidio (MILL, 1978).

Sin embargo HILL (1972) observa en varias especies de Poliquetos sedentarios que regeneraban la cola cuando el cerebro les había sido extirpado. También en los Oligoquetos observamos estas contradicciones. GERSCH y WOHLRABE (1965) en el Oligoqueto limícola *Enchytraeus* sp. demostraron que el cerebro era indispensable para que tuvieran lugar una regeneración caudal. Ya HARMS (1948) había emitido la hipótesis de que la neurosecreción cerebral ejercía una acción estimulada-

ra de la regeneración posterior. Pero los primeros datos experimentales sobre regeneración caudal en Oligoquetos terrícolas se deben a HUBL (1956 a). En los trabajos experimentales llevados a cabo en Allolobophora terrestris f. longa y en Eisenia foetida comprueba cómo en estos Oligoquetos, al igual que ocurre en los Poliquetos, el cerebro es indispensable para regenerar los segmentos amputados caudalmente. Observa que si las lombrices son amputadas simultáneamente de la región cefálica y caudal, no son capaces de regenerar la cola; pero si la amputación caudal se realiza 24-48 horas antes que la descerebración, el animal regenera normalmente los segmentos caudales extirpados. Considera que la neurosecreción cerebral es estimuladora de la regeneración caudal y que interviene indirectamente a través de las "células U" del ganglio subesofágico.

GALLISSIAN (1963) en Eophila pyrenaica observa cómo la ablación de los ganglios cerebroides determina en todo momento del período de actividad, una diapausa característica, acompañada en la mayor parte de los casos, de un poder de regeneración caudal.

MICHON, MAISSIAT y ANGEVAIN (1964) en sus trabajos sobre Eiseniella tetraedra f. typica (que regenera sin interrumpir su actividad), encuentran que la regeneración caudal dependería de dos factores antagonistas, uno inhibidor, secretado por las "células b" del cerebro, y otro estimulador elaborado por las "células U" del ganglio subesofágico, es decir, existen para ellos un claro antagonismo

entre el cerebro, que inhibiría la regeneración caudal, y el ganglio subesofágico, que sería estimulador de la misma.

Más tarde MAISSIAT (1965) también comprueba los mismos resultados en el lumbrícido A. chlorotica, en la que los ganglios supraesofágicos tienen un papel inhibidor en la regeneración de los segmentos caudales extirpados.

JUBERTHIE y MESTROV (1965 a) en el Oligoqueto Eophila pyrenaica llegan a la conclusión de que la inhibición de la regeneración está ligada a la presencia de los segmentos anteriores, es decir, para estos autores, ni el cerebro ni el ganglio subesofágico son necesarios para que se produzca regeneración caudal.

También SAUSSEY (1966) en A. icterica observa cómo la extirpación del cerebro entraña una entrada en diapausa acompañada de una regeneración posterior, aunque los procesos regenerativos sean un poco lentos y apunta que este poder inhibidor del ganglio cerebral podría compararse a la acción de las secreciones cerebrales que inhiben la muda en los Miriápodos Quilópodos (JOLY, 1962).

Por otro lado, MARCEL (1970 a, b) en sus trabajos efectuados "in vivo" sobre E. foetida f. typica comprueba que los triturados de cerebro no ejercen ninguna influencia favorecedora sobre la regeneración caudal; el papel trófico, que sin duda contienen, porque ha sido puesto de manifiesto experimentalmente por su acción positiva sobre la regeneración anterior (MARCEL, 1970 b), no parece ser eficaz en la regeneración de los últimos segmentos amputados.

GALLISSIAN (1973) en Eophila dollfusi llega a la conclusión de que las "células a" del cerebro son las responsables de la acción inhibidora ejercida por los ganglios cerebroides sobre la regeneración posterior.

STEPHAN-DUBOIS (1980) en el Anélido Oligoqueto Tubifex tubifex, encuentra un efecto inhibidor del cerebro sobre la regeneración caudal y considera que este poder inhibidor enmascara en cierta medida el efecto estimulador de los ganglios de la cadena nerviosa ventral.

Así pues, vemos que todos estos autores, contrariamente a las primeras observaciones de HUBL (1956 a, b) atribuyen al cerebro un papel inhibidor de la regeneración caudal.

#### B) Papel del ganglio subfaríngeo.

Son varios los autores que atribuyen al ganglio subfaríngeo un papel primordial en la regeneración de los segmentos posteriores. Así HUBL (1956 a, b) en los experimentos realizados sobre A. terrestris f. longa y Eisenia foetida observó que el ganglio subfaríngeo y primeros ganglios de la cadena nerviosa ventral son indispensables para que haya regeneración caudal, por tanto atribuye al ganglio subfaríngeo un papel estimulador de los procesos regenerativos igual que al cerebro.

AROS y VIGH (1961 b) también observan que hay una relación entre la neurosecreción de las células subfaríngeas y la regeneración caudal en Lumbricus.

MICHON (1962) considera que las "células U" del ganglio subfaríngeo de A. terrestris f. typica elaboran un factor que favorece la regeneración de la cola igualmente que el producto secretado por las dos gruesas células neurosecretoras de cada ganglio de la cadena nerviosa ventral. Más tarde, MICHON, MAISSAIAT y ANGEVAIN (1964) en el Lumbrícido Eiseniella tetraedra f. typica también comprueban que las células neurosecretoras del ganglio subfaríngeo producen un factor estimulante de la regeneración caudal.

Sin embargo, SAUSSEY (1966) en A. ictérica considera que el ganglio subfaríngeo y primeros ganglios de la cadena nerviosa no son necesarios para el desarrollo del regenerado, sino que ejercen una acción inhibitoria paralela a la del cerebro, aunque el poder inhibitor del ganglio cerebral es superior al del ganglio subfaríngeo.

#### C) Papel de los centros nerviosos anteriores.

Por último, también se han hecho experimentos con lombrices a las que les han sido amputados los centros nerviosos anteriores (ganglios cerebrales, ganglios subesofágicos y primeros ganglios de la cadena nerviosa ventral) y, simultáneamente, los últimos segmentos del cuerpo. LIEBMANN (1942) y GATES (1950) en Eisenia foetida observan que después de amputar simultáneamente la región cefálica y región caudal en distintos niveles, había regeneración de los segmentos posterio

res en todos los casos. También JUBERTHIE y MESTROV (1965 a) en sus trabajos sobre Eophila pyrenaica amputada de los centros nerviosos anteriores y de los últimos segmentos caudales, observan una regeneración de la cola. Estos autores, como ya dijimos anteriormente, atribuyen esta capacidad regenerativa a ciertas células neurosecretoras de la cadena nerviosa ventral que producen un factor estimulador de la regeneración. Por ello, consideran que los centros nerviosos anteriores juegan un papel inhibitor en la regeneración caudal.

Este resultado coincide con el obtenido por SAUSSEY (1982-1966) en la especie anfodínoma Allolobophora icterica en la que la ablación simultánea de los centros nerviosos y de los últimos segmentos determina una inhibición de la actividad del animal y favorece la regeneración de los segmentos extirpados.

STEPHAN-DUBOIS (1980) en el Anélido Oligoqueto Tubifex tubifex estudia la influencia de la región cefálica sobre la regeneración posterior y llega a la conclusión de que "la regeneración caudal es tanto más estimulada cuanto menor sea el número de segmentos anteriores suprimidos", es decir, la estimulación de la regeneración de los últimos segmentos es máxima si sólo el cerebro, sus comisuras y el primer ganglio de la cadena nerviosa ventral están ausentes. También observa que esta estimulación disminuye de intensidad cuando a los animales se les extirpa un mayor número de ganglios.



D) Papel de la cadena nerviosa ventral.

Para que una lombriz de tierra pueda regenerar es necesario hacerle un corte profundo que afecte a la cadena nerviosa.

El papel de la cadena nerviosa ventral en la regeneración de los Oligoquetos fue puesto de manifiesto por AVEL (1947), el cual demostró que la cadena nerviosa no determina la naturaleza del regenerado (cefálica o caudal), pero es necesaria para una regeneración normal, pues provoca la proliferación de los tejidos ectomesodérmicos, aportando seguramente factores mitógenos y sustancias que favorecen la síntesis de las proteínas. (GRASSE, 1959)

También AVEL (1961) observa en Eisenia foetida unicolor cómo la resección de la cadena nerviosa impide la regeneración cefálica y atribuye, un papel activador o trófico a la cadena nerviosa en los procesos de regeneración.

Más recientemente BOUC-LASSALLE (1968) demuestra en Eisenia foetida que en ausencia de inervación las heridas de la pared del cuerpo cicatrizan mal.

JUBERTHIE y MESTROV (1965) en sus trabajos en Eophila pyrenaica han observado que, cuando a este animal se le amputa simultáneamente la cabeza y la cola, existe una regeneración caudal. Esta capacidad para regenerar la cola la atribuyen a ciertas células neurosecretoras de la cadena nerviosa ventral que producen un factor estimulador de la regeneración caudal. Ellos observan en el frente de sección, un aumento del número de células neurosecretoras y una acumulación del

producto de secreción. También observan una fuerte actividad secretora de las células neuróglícas. Para estos autores, la presencia de la cadena nerviosa es pues suficiente para que la regeneración posterior se produzca, y esta cadena nerviosa interviene por el producto de neurosecreción de sus células, es decir, "la regeneración caudal está bajo la dependencia de la neurosecreción de un número de ganglios de la cadena nerviosa próximos a la sección".

HERLANT-MEEWIS (1962 a) encontró en Eisenia foetida cuatro categorías de células neurosecretoras en la cadena nerviosa ventral. Estas células, colocadas lateralmente envían sus axones hacia el neuropilo. Más recientemente HERLANT-MEEWIS y GALLARDO (1965) y HERLANT-MEEWIS (1971) han observado en Eisenia variaciones de la cromofilia de ciertas neuronas neurosecretoras de la cadena nerviosa ventral en relación con la cicatrización y regeneración. En las lombrices jóvenes en regeneración se observa una activación de las células "C1" y "C2" inmediatamente después de la sección. Los adultos muestran un desbloqueo de las células "C1" y "C2" durante la formación del tapón cicatricial: los gránulos aparecen visibles en el pericarión y en el axón. Para estos autores esta actividad se manifiesta únicamente durante la cicatrización y formación del blastema.

DHAINAUT-COURTOIS y WAREMBOURG (1967) y WAREMBOURG (1968) en sus trabajos sobre el Anélido Poliqueto Nereis pelagica han observado variaciones de las células de la cadena nerviosa en relación con la regeneración. Según estos autores las células neurosecretoras fucsínófilas (FP) se descargan in-

mediatamente después de la amputación, seguramente debido al stress sufrido. Como consecuencia de la amputación caudal, las células neurosecretoras de la cadena nerviosa aumentan de volúmen, muestran una gran actividad secretora y son fuertemente coloreadas por la fucsina, e igualmente neuronas ordinarias aumentan su actividad.

CHAPRON (1970 a, b) ha estudiado las neuronas de la cadena nerviosa ventral de Eisenia foetida inmediatamente detrás del nivel de amputación y encuentra varios tipos de células con caracteres secretores, que varían por el tamaño de sus granulaciones. De los cuatro tipos descritos por él, las células de "tipo 3" elaboran gránulos de 800-1100 Å de diámetro, que son precisamente los que se encuentran en las fibras nerviosas que se observan en la sección del corte. Estos gránulos serían, según este autor, la neurohormona responsable de la histólisis del tapón cicatricial, seguramente la dopamina (CHAPRON y CHAPRON 1972). Esta amina biógena induciría a la formación en las células cicatriciales del AMP cíclico regulando la actividad de los lisosomas.

MARCEL (1973 a) observa en los ganglios nerviosos de la cuerda ventral de Eisenia, próximos al nivel de sección, la disposición de las neuronas neurosecretoras y estudia los ciclos secretores de estas neuronas en el curso de la regeneración cefálica y caudal, en Eisenia foetida. Este ciclo comprende cuatro fases sucesivas de descarga y recarga de células FP (teñidas con fucsina-paraldehído). Estas fases son relativamente semejantes en los dos casos. Lo único que varía es la duración de las mismas.

La fase primera (P1), de descarga, es más larga y el vaciamiento más completo en la regeneración caudal que en la regeneración cefálica. Esta sustancia intervendría en la movilización de los celomocitos, siendo esta descarga una respuesta al stress provocado por la herida. La fase segunda (P2) de recarga, se efectuaría cuando se forma el tapón cicatricial. La fase tercera (P3), de descarga, se caracteriza porque su secretado actúa fundamentalmente durante la histólisis del tapón de la herida. (En la regeneración caudal la histólisis es más larga que en la regeneración cefálica). En la fase cuarta (P4) se efectúa simultáneamente la síntesis y descarga de un "factor trófico" que actúa sobre la formación del regenerado propiamente dicho y su aumento de tamaño.

MARCEL llega a la conclusión de que el mecanismo de la regeneración parece estar regulado por dos factores, "inhibidor" y "trófico". El "factor inhibidor", específico de una región (cefálica o caudal), sería progresivamente elaborado en el curso de la formación del regenerado.

El "factor trófico" es necesario para el desencadenamiento y desarrollo de los procesos de morfogénesis regeneradora. Este factor parece actuar en tres fases: a) movilización de los celomocitos; b) histólisis del tapón cicatricial; c) crecimiento del regenerado (MARCEL, 1972, b, c). Las sustancias inhibitoras específicas, cefálica o caudal, actúan sobre el ciclo modificando alguna de las fases, dando como resultado una acción inhibidora indirecta sobre la formación del regenerado.

En unos trabajos anteriores sobre Eisenia, MARCEL

(1967 a, b; 1968; 1970 a, b, c), había demostrado cómo estos inhibidores específicos impiden "in vitro", o al menos, retardan "in vivo" la formación de un regenerado cefálico o caudal.

Este autor ha comprobado en sus trabajos experimentales con homogenados de cabezas o de colas que en el curso de la regeneración cefálica o caudal el tapón cicatricial se forma a pesar de la presencia del inhibidor. Por el contrario, su destrucción no tiene lugar "in vitro" o es muy lenta "in vivo". Por tanto, se puede decir, que es este período de histolisis de este tejido el que es sensible al inhibidor. Los estados siguientes durante los cuales se forma el blastema, y se dividen sus elementos, no son afectados por esta sustancia.

MARCEL (1972 c) comprueba que si se aumenta la concentración del "factor trófico" proveniente de un homogenado de colas, se acelera la destrucción del tapón cicatricial. Piensa, pues, que la sustancia trófica elaborada por las neuronas ventrales actuaría sobre estas histolisis. Estos resultados confirman los obtenidos por CHAPRON (1966 a, b, c), en Eisenia, cuando observó en las fibras nerviosas de la cadena ventral, en la histolisis del tapón cicatricial, gránulos de la misma talla media, iguales a los de ciertas neuronas de la cuerda nerviosa. Esta neurosecrección tendría un papel trófico y sería responsable de la destrucción del tapón cicatricial, como dijimos anteriormente.

MOMENT (1975) también es de la opinión de que la información que determina el número de segmentos que se regenerarán posteriormente en los gusanos, reside en los tejidos

adyacentes a la superficie del corte.

Para STEPHAN-DUBOIS (1980), en Tubifex, los ganglios de la cadena nerviosa ventral tienen un efecto estimulador de la regeneración caudal, pero este efecto estimulador queda enmascarado por el efecto inhibidor del cerebro.

#### E) Autoinhibición.

Los estudios más recientes (MARCEL, 1980) han puesto de manifiesto que en el curso de la regeneración existe una autoinhibición. En los organismos que son capaces de regenerar, se supone que un factor humoral es el que transmite la información sobre el estado de avance del regenerado, el cual se detiene al nivel de la parte vieja; por tanto, todo órgano impide con su presencia el desarrollo de una estructura homóloga: esto es lo que se llama autoinhibición. Parece ser pues, que en los diferentes órganos existen sustancias químicas especializadas, llamadas inhibidores, que son de origen endógeno. La naturaleza de estos autoinhibidores no es bien conocida. Se sabe, sin embargo, que son fácilmente solubles y que se pueden extraer por homogeneización. La mayoría son sustancias proteicas: en los hidrarios son proteínas básicas, electropositivas (ROSE, 1966; LENICQUE y LUNDBLAD, 1966 a y MULLER, 1969); en Clava esquamata el factor inhibidor es una proteína electronegativa (STEELE y LANGE, 1977); en Eisenia foetida es un péptido (CARDON y MARCEL, 1976); estos autores han demos-

trado que el factor inhibidor de la regeneración cefálica de E. foetida es destruido por la pronasa y por la tripsina, lo que prueba que es de naturaleza peptídica y de pequeña masa molecular.

Otros autores, tales como PUCCIA y DURANTE (1973) consideran que el inhibidor del opérculo rudimentario del poliqueto Hydroides norvegica es el AMP.

Según CHAPRON y CHAPRON (1976) también el nucleótido AMP puede ser la sustancia que específicamente inhibe la regeneración cefálica en Eisenia foetida.

MARCEL (1980) considera la hipótesis de que las neurosecreciones peptidérgicas de las células neurosecretoras del ganglio cerebral de Eisenia foetida, descritas por HERLANT-MEEWIS (1955) y FERRER DE MORAIS y cols. (1979), podrían ser un inhibidor, aunque esto no ha sido confirmado.

Puesto que un órgano inhibe la regeneración de su homólogo se puede pensar que el factor inhibidor es elaborado por este órgano y difundido en torno a él. Parece ser que el inhibidor sólo actúa en los primeros estados de la regeneración, y que su presencia es necesaria al menos durante tres horas, y sus efectos duran ocho horas. Así lo han demostrado Mc WILLIAMS y cols. (1968) en la Hydra viridis, SMITH (1964) en Clymenella y MARCEL (1970 a) en Eisenia foetida.

Se supone que los inhibidores actúan, bien sobre las células que intervienen en la formación de los tejidos del regenerado, impidiendo la diferenciación celular del mismo, o bien pueden actuar sobre los sistemas humorales llamados

"promotores" o "tróficos", que favorecen la regeneración. Un ejemplo del modo de acción sobre las células de regeneración se ha visto con las proteínas básicas inhibidoras de Tubularia, que impiden la diferenciación de células del regenerado (ROSE, 1955, 1966). Por otro lado, SCHALLER (1976) cree que el inhibidor de la cabeza en la Hydra actúa sobre las células epiteliales e intersticiales de la yema de regeneración, impidiendo la división mitótica de las mismas.

McWILLIAMS y cols. (1970) consideran que el factor inhibidor del disco basal de la Hydra regula la regeneración de este disco gracias a un "feed-back" de intensidad continuamente variable que actúa sobre la diferenciación; es decir el inhibidor impide la síntesis de proteínas necesarias para la diferenciación.

En cuanto a la acción sobre los sistemas promotores LENICQUE y LUNDBLAD (1966 b) observan como las histonas, responsables de la inhibición en Clava squamata interactúan con las nucleoproteínas que constituyen el promotor de la regeneración. MULLER (1969) también observa una interferencia del inhibidor de Hydractinia con las sustancias inductoras peptídicas.

En Eisenia, el inhibidor modifica la duración de las fases del ciclo secretor de la "sustancia trófica" a nivel de las neuronas de la cadena ventral (MARCEL, 1973 b), actuando sobre las células encargadas de sintetizar los promotores; es decir, estas neuronas, verdaderamente secretoras de la sustancia trófica, serían también las células blanco del inhibidor. El factor que inhibe la regeneración cefálica de Eisenia



ha sido casi completamente purificado. Es un pequeño péptido, probablemente lineal, cuyo peso molecular está alrededor de 2000 (MARCEL y CARDON, 1979).

CHAPRON y CHAPRON (1974) consideran que el AMP identificado por DURANTE y PUCCIA en los hidroideos tiene una acción antimitótica.

El AMPc parece que tiene una actividad más o menos inhibidora en las planarias (LENICQUE, 1976), y en Eisenia (CHAPRON y CHAPRON 1974). Esta actividad del AMP cíclico proviene sin duda del AMP, producto de la hidrólisis fosfodiesterásica del nucleótido cíclico.

#### IV. Factores que influyen en la regeneración caudal.

La capacidad regenerativa de una lombriz está condicionada por una serie de factores externos o extrínsecos como luz, temperatura, nutrición, humedad, etc., y por factores internos o intrínsecos consecutivos a un stress (nivel de amputación, grado de desarrollo, etc.).

Hasta cierto punto el aumento de temperatura acelera la regeneración. Una temperatura excesivamente elevada puede ser letal (BALINSKY, 1965). MOMENT (1953) en Eisenia foetida se da cuenta de que la temperatura ejerce una influencia positiva sobre el número de segmentos regenerados: los animales amputados de los centros nerviosos anteriores y a nivel del segmento 50/51, colocados a una temperatura de 20°C regeneraban una media de 32,4 segmentos, mientras que si son colocados a 25°C la media era de 40,8 segmentos regenerados.

SAUSSEY (1961) en Allolobophora ictérica comprueba cómo en invierno o en baja temperatura la diapausa y la regeneración caudal no tienen lugar; en verano o a una temperatura próxima a los 20°C las lombrices amputadas caudalmente entraban en diapausa y regeneraban.

También en el Poliqueto Platynereis dumerilii, HAUENSCHILD (1960 b) ha observado la influencia de la temperatura en la liberación de hormona cerebral.

En cuanto a la luz, MAISSIAT (1965) demostró en A. chlorotica la gran sensibilidad de las células neurosecretoras sometidas a radiaciones luminosas, las cuales producían una disminución progresiva y cesación de la neurosecreción.

Igualmente HAUENSCHILD (1960 b, 1975) en sus trabajos sobre el Poliqueto Platynereis dumerilii puso de manifiesto que la liberación de la hormona de la regeneración estaba influida por el fotoperíodo cambiante.

La humedad es otro factor importante en la regeneración caudal. SAUSSEY (1961) apunta que una desecación lenta del medio favorece el enrollamiento y la regeneración y que, en un medio muy húmedo, las lombrices no se enrollan pero regeneran, aunque lo hacen muy lentamente.

La alimentación parece no influir demasiado en la regeneración, pues animales en ayunas pueden regenerar a expensas de sus reservas internas. Lo que sí ocurre es que disminuye el tamaño del animal.

Sin embargo el oxígeno parece ser una condición necesaria para la regeneración y puede afectar a la velocidad del proceso (BALINSKY, 1965).

También parece muy importante tener en cuenta el nivel de amputación caudal. SAUSSEY (1964) estudia sobre Allolobophora icterica la importancia del nivel de amputación en el determinismo de la regeneración caudal y comprueba que el desarrollo de los regenerados varía en función del número de segmentos amputados en la región caudal, y el poder de regeneración varía siguiendo un gradiente postero-anterior, es decir, la regeneración es tanto más rápida cuanto mayor sea el número de segmentos amputados.

JUBERTHIE y MESTROV (1965 b) puso de manifiesto en Eisenia foetida que en los animales adultos cortados a nivel del segmento 62, la regeneración se efectuaba en ausencia del

cerebro, del ganglio subesofágico y de los 20 primeros ganglios de la cadena nerviosa ventral; pero si la amputación es de menor número de segmentos, por ejemplo de los 10 últimos, la regeneración es sólo del 20% al 40%.

Posteriormente SAUSSEY (1973) en A. terrestris f. typica observa que los potenciales regenerativos de la especie varían considerablemente a lo largo del año, influyendo diversos factores: época del año, nivel de amputación y edad de la lombriz. Según este autor la obtención de regenerados caudales está subordinada a la importancia de la amputación caudal; si son pocos los segmentos amputados (30) no regeneran ni adultos ni jóvenes; si son muchos (100) en adultos regeneran el 75%, en los muy jóvenes, si son 60 los segmentos amputados, regeneran el 87%.

MIN JA SONG y SAUSSEY (1976) en sus estudios sobre el Oligoqueto Nicodrilus giardi confirman lo anteriormente expuesto. Pero los trabajos más interesantes y completos han sido llevados a cabo por MOMENT (1975, 1979, 1980). Este autor demuestra en Eisenia foetida que el número de segmentos regenerados es tanto menor cuanto menos sean los segmentos caudales amputados y observa que cuando el nivel de amputación se mueve 10 segmentos hacia la extremidad posterior, el número medio de segmentos regenerados disminuye por 10. El hambre, la temperatura y el grado de respiración no cambian esta regla, pero afectan al número de segmentos.

Aunque la baja temperatura afecta grandemente a la tasa de regeneración, el número de segmentos producidos sólo está ligeramente disminuído. Igualmente el grado de respira-

ción modifica en gran manera la velocidad de crecimiento en longitud, pero sólo modifica el número de segmentos un poco.

La regeneración, la irradiación, los extractos de tejidos, la electroforesis de proteínas indican que el control de la regeneración reside en los tejidos adyacentes a la superficie de amputación. La regeneración se detiene en las lombrices, igual que ocurre en la regeneración de un miembro de los urodelos (Caudata) solamente, cuando las estructuras distales del nivel de amputación se forman. El final de la regeneración se debe a alguna clase de diferenciación terminal.

Este autor concluye que la presencia o ausencia de un cerebro o de los segmentos amputados no afecta a la cantidad de regeneración que siempre se para en alguna posición proporcionada. Sólomente el nivel de amputación es importante.

#### V. Regeneración y reproducción.

En los Anélidos la producción de neurohormonas parece ser va asociada no sólo con la regeneración sino también con otros fenómenos biológicos tales como la reproducción y el desarrollo de los caracteres sexuales somáticos (LAVERACK, 1963). En los Poliquetos Nereidos, DURCHON (1951, 1956) demostró que el cerebro ejercía una acción inhibidora sobre los elementos genitales. CASANOVA (1955) en Platynereis massiliensis observa que la regeneración es más débil en los individuos maduros que en los jóvenes. Hechos semejantes han sido contactados por DURCHON (1956) en Nereis costae, STEPHAN-DUBOIS (1956) en Nereis diversicolor y HAUENSCHILD (1960 a) en Platynereis dumerilii. Estos autores interpretan este hecho de dos formas: o la facultad de regeneración desaparece progresivamente, o la secreción de la hormona cerebral es tanto más débil cuanto más edad tiene el animal. Así, HAUENSCHILD (1960 a) comprueba que los ganglios cerebroides de los individuos jóvenes de Platynereis dumerilii son más eficaces que los de los animales próximos a la madurez genital.

Por otro lado, SCULLY (1964), en Nereis obtiene regenerados de animales de edad, amputados posteriormente y a los que les han sido implantados cerebros de individuos jóvenes.

Se puede decir que el cerebro de Nereis ejerce una acción estimuladora en los procesos de regeneración posterior; pero así como para HAUENSCHILD (1960 a), la hormona inhibidora de la maduración sexual y de la epitoquia rige igualmente los fenómenos de regeneración caudal, para CLARK y CLARK (1959)

el cerebro de los Nereidos secretaría, además de la hormona inhibidora de la maduración genital, otras dos: una hormona de crecimiento y una hormona de regeneración.

Posteriormente DURCHON y SCHALLER (1963) y DURCHON (1967), con sus métodos de cultivos organotípicos han demostrado claramente la acción directa de la neurosecreción sobre la sexualidad en Nereis diversicolor. Para ello, amputaron parápodos a un mismo individuo, unos los mantuvieron aislados, y otros asociados con un prostomio, en cultivos organotípicos; en el primer caso, se observan perfectamente las divisiones de maduración de las células sexuales desde el cuarto día de cultivo; en el segundo caso, las espermatogonias, después de un mes, tienen el mismo aspecto que presentaban en el momento de la puesta en cultivo. Esto viene a corroborar los trabajos de DURCHON (1956), en donde la acción inhibidora del cerebro actúa sobre la maduración de los elementos genitales.

GOLDING (1967 a) observa que hay una estrecha relación entre la capacidad regenerativa de los Poliquetos y la concentración de hormona en el cerebro de los animales maduros, y ello le lleva a pensar que la estimulación de la regeneración caudal y la inhibición de la maduración genital es diferente actividad fisiológica de una misma hormona liberada desde el ganglio cerebral. Esta hormona cerebral estaría sujeta a un control feedback negativo ejercido por los oocitos en desarrollo, como ya había observado DURCHON (1952).

En 1971, DURCHON y PORCHET demuestran que el metabolismo genital está regulado, en los Nereidos, por el decreci-

miento regular del nivel de la actividad endocrina cerebral. Más tarde, PORCHET y CARDON (1972) observan que las hembras submaduras poseen en su cavidad celómica una sustancia capaz de inactivar la producción hormonal del prostomio. Esta sustancia, en inyección intracelómica en una determinada proporción, impide totalmente la regeneración posterior así como una maduración genital precoz. Así pues, llegan a la conclusión de que en los Nereidos la actividad inhibidora por un lado, y la maduración genital por otro se controlan mutuamente a lo largo de la vida del animal por intermedio de sustancias químicas.

También DURCHON, DHAINAUT y PORCHET (1978) comprueban en los Anélidos Poliquetos cómo la reproducción está controlada por un centro endocrino cerebral: la neurosecreción cerebral libera una hormona que controla el desarrollo del oocito.

HAGADOR (1966) en los anélidos HIRUDO medicinalis y Theromyzon rude observa la influencia gonadotrópica del cerebro. Demuestra que la extirpación del cerebro interfiere en la maduración del esperma en ambas especies al inyectar cerebros macerados en animales descerebrados.

Encuentra en el cerebro dos tipos de células neurosecretoras ( $\alpha$  y  $\beta$ ). Las "células  $\alpha$ " se tiñen muy bien con la fucsina paraldehído y son ricas en cistina. Las "células  $\beta$ " tienen secreción acidófila y son pobres en cistina. Supone HAGADOR que en las "células  $\alpha$ " está el origen del factor gonadotrópico.



En cuanto a los Oligoquetos, HUBL (1953) puso de manifiesto que las secreciones cerebrales en los Lumbrícidos están íntimamente relacionadas con la sexualidad, y que parecía que existía un antagonismo entre ésta y la regeneración caudal.

También HERLANT-MEEWIS (1954) observa en sus trabajos sobre Eisenia foetida, que existe esta relación entre el sistema nervioso y la gametogénesis, es decir, la actividad reproductora de Eisenia foetida está ligada a la emisión de un producto de neurosecreción cerebral; y en los experimentos realizados sobre esta lombriz en 1956-1957 demuestra que la neurosecreción controla la actividad genital y el desarrollo de los caracteres sexuales externos y llega a la conclusión de que la extirpación de los centros nerviosos anteriores determina una detención de la puesta y la regresión de los caracteres sexuales somáticos, y atribuye a las "células a" de los ganglios cerebrales el control del desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, siendo sus secreciones eliminadas por vía sanguínea. Más tarde, esta autora, en 1959 y 1966 a, constata que cuando se extirpa el sistema nervioso cefálico el tracto genital y los caracteres secundarios sufren una involución paralela. Si como AVEL (1929) opinaba, el desarrollo de estos caracteres sexuales somáticos no está bajo la dependencia del aparato genital, se supone que tiene que existir un factor humoral que condicione a ambos en el mismo sentido. En favor de esta hipótesis están los trabajos realizados por GALLISSIAN (1963) en Eophila dollfusi y por BERJON (1965) en Eisenia foetida

en donde se pone en evidencia la influencia ejercida por el cerebro sobre el desarrollo del clitelo que, como es sabido, es un carácter sexual que se presenta en el momento de la madurez genital y que, como ya demostrara HUBL no depende de la actividad del aparato genital, sino que su desarrollo se superpone al del aparato reproductor.

RUDE y LINDER (1964) constatan que en Eisenia foetida, no sólo la meiosis está condicionada por un factor humoral, sino que éste es de origen cerebral. Así lo demostró en sus experimentos, implantando ganglios cerebroides, extirpados a animales maduros, en la cavidad celómica de Eisenia descerebradas.

SAUSSEY (1966) observa que en los Oligoquetos ocurre lo contrario que en los Poliquetos, es decir, las sustancias neurosecretoras del cerebro inhiben la regeneración y estimulan la maduración sexual. En efecto, en sus trabajos sobre A. ictérica observa que la aparición del regenerado caudal lleva consigo el bloqueo de la sexualidad y el vaciamiento de las "células a". Considera pues, que la descerebración de la lombriz provocaría un paro de la actividad genital e indirectamente favorecería la formación de un regenerado caudal.

Según SAUSSEY (1970) la sexualidad en los Lumbrícidos parece depender de un factor humoral que es elaborado por ciertas células neurosecretoras de los centros nerviosos anteriores, en especial por las "células a" de los ganglios cerebrales.

Posteriormente GOLDING (1974 b) se da cuenta de que las

especies anfodinamas como Allolobophora y Eophila sólo pueden regenerar en período de diapausa, cuando hay un paro total de la actividad genital, con regresión de los caracteres sexuales primarios y secundarios, y que en las especies homodinamas como Eisenia y Lumbricus, ocurre lo mismo cuando se amputan los segmentos caudales. Este hecho lleva a GOLDING a suponer que una única hormona puede estar envuelta en la reproducción sexual, la retirada de la cual permitiría la regeneración de los segmentos posteriores amputados.

HERLANT-MEEWIS, DE VRIES-SCHOUMACKER y FERRER DEMORAIS (1977) en un estudio ultraestructural de células neurosecretoras de Eisenia foetida observaron que a nivel de la cadena nerviosa ventral, los ganglios de la zona genital se caracterizan por la presencia de dos tipos de células neurosecretoras que parecen implicadas en los fenómenos sexuales: son las llamadas "C 4" y "CM".

Todas estas células de tipo peptidérgico están acompañadas de células aminérgicas que encierran gránulos claramente más pequeños, que se iluminan por las técnicas de fluorescencia que ponen en evidencia las diferentes aminos.

También encuentran en la parte posterior de los ganglios cerebroides dos categorías de "células a" que se caracterizan por sus gránulos irregulares de forma. En el momento de la pubertad aparece en la misma región celular en la que se elaboran, gránulos muy voluminosos, poco densos a los electrones. En el momento del acoplamiento y puesta, un cuarto tipo de células situadas lateroventralmente se activan y se llenan de

gránulos semejantes a los de las células "C4" de la cadena nerviosa.

LATTAUD (1980) observó que no había ninguna prueba de la existencia de un control endocrino del sexo de las gónadas. La existencia de tal control la ha obtenido con los cultivos organotípicos. Este autor ha demostrado que en el Oligoqueto E. foetida, en período de actividad genital, "los tejidos testiculares elaboran un andrógeno bajo el control de una neurohormona liberada por el sistema nervioso central". Para lo cual asoció en cultivo organotípico ovarios y testículos con diferentes ganglios de la cadena nerviosa para buscar el lugar de síntesis de esta neurohormona.

Los (g. cerebrales) + (ovarios y testículos) = 3% de transformación de testículos en ovotestis.

Los (g. subesofágicos) + (ovarios y testículos) = 32%.

Los (g. de segmentos genitales ♀ o ♂) + (ovarios y testículos) = 17%.

Ya en 1973, LATTAUD había demostrado que la ovogénesis es una autodiferenciación, es decir, que la diferenciación de gonias en ovogonias y sus transformación en ovocitos se efectúa en ausencia de toda sustancia inductora, mientras que la diferenciación de gonias en espermatogonias necesita una sustancia andrógena elaborada por los testículos bajo el control de la neurosecreción. Llega a la conclusión de que "sólo los ganglios cerebroides son capaces de estimular la secreción del andrógeno testicular y de mantener espermatogénesis en los testículos, es decir, los ganglios cerebroides

liberan una hormona cerebral que induce la espermatogénesis.

También en el cultivo organotípico se observa que los segmentos genitales ♀ y ♂ no ejercen ninguna acción endocrina sobre la liberación de andrógeno por los tejidos testiculares, aunque es posible que tengan algún papel en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios.

Se puede decir de todo lo expuesto que en los Poliquetos Nereidos las neurohormonas cerebrales inhibirían la maduración genital y estimularían la regeneración. Por el contrario, en los Oligoquetos la neurosecreción del cerebro sería estimuladora de la maduración genital e inhibidora de la regeneración caudal; o sea la neurosecreción del cerebro ejercería una acción opuesta en Poliquetos y en Oligoquetos.

## VI. Diapausa

Muchos de los autores que se han interesado en la regeneración caudal de las lombrices han relacionado este fenómeno con la diapausa, que es un estado de inmovilidad característico, especie de letargo, debido a factores externos e internos, cuyo desencadenamiento parece estar sometido a un determinismo de origen cerebral y de naturaleza humoral.

En los Oligoquetos Lumbrícidos se han observado diversas formas de diapausa: diapausa verdadera u obligatoria, aparece espontáneamente aunque las condiciones del medio sean favorables para la vida activa del animal. Las lombrices durante este tiempo se enrollan siempre aisladamente, vacían su intestino y los individuos maduros sufren una regresión de los caracteres sexuales somáticos. No se produce en ellos deshidratación de los tejidos, aunque el animal pierda aproximadamente la mitad del peso que tenía al comienzo de la diapausa (MICHON, 1954). En este estado permanecen uno o dos meses, y ni la inmersión en agua, ni la excitación mecánica es capaz de despertarlos. El despertar es espontáneo y es precisamente en este período de reposo cuando el animal es capaz de regenerar los segmentos amputados caudalmente. Este tipo de diapausa fue observado por AVEL (1928, 1929) en A. terrestris f. typica y f. longa, y más tarde por BOULOT y GALLISSIAN (1960) en Eophila dollfussi. MICHON también observa este tipo de diapausa en las lombrices amputadas de su extremidad caudal y sometidas a una lenta y gradual desecación del medio,

produciéndose al mismo tiempo en ellas la regeneración de la cola.

En resumen, para MICHON (1954) además de este tipo de diapausa obligada, semejante a la que sufren los insectos, existe otro tipo de inmovilidad, al que llama "quiescencia", que se produce por deterioro de algún factor del medio, principalmente por una desecación rápida de éste. Las lombrices quiescentes sufren una fuerte deshidratación, pero vuelven rápidamente a su vida cuando se restauran las condiciones normales de humedad. Durante este período las lombrices no son capaces de regenerar la cola.

SCHMIDT (1918), fue el primero en observar este fenómeno en Eisenia foetida. SAUSSEY (1966) señala también en A. icterica una forma especial de diapausa que tiene la mayor parte de los caracteres de una diapausa verdadera, esto es: enrollamiento aislado del animal, paro de la actividad genital, y desaparición de los caracteres sexuales somáticos de las lombrices adultas. Durante este período no sufren deshidratación y son capaces de regenerar los segmentos caudales amputados. Sin embargo, una rehidratación del medio puede, en cualquier momento, provocar el despertar del animal. A este tipo especial de letargo es al que llama SAUSSEY para-diapausa.

Por último, también puede provocarse una suspensión de la actividad de las lombrices cuando son sometidas a operaciones quirúrgicas como extirpación de los centros nerviosos anteriores. Las lombrices quedan en un estado de inmovilidad semejante a la diapausa, al que SAUSSEY (1966) designa con el

nombre de pseudo-diapausa. Los animales en este estado se enrollan aisladamente, vacían su intestino y los caracteres somáticos sexuales degeneran y desaparecen. Los individuos amputados caudalmente regeneran la cola. Esta pseudo-diapausa ha sido puesta de manifiesto por SAUSSEY (1962, 1966) en A. icterica, A. terrestris f. typica y f. longa y en A. chlorotica; por GALLISSIAN (1963) en Eophila dollfussi y por JUBERTHIE y MESTROV (1965 a) en Eophila pyrenaica.

Para OMODEO (1948) sólo existen especies con diapausa obligatoria (especies heterodínamas) debida a factores endógenos, y diapausa facultativa (especies homodínamas) en la que la diapausa sobreviene por cambios desfavorables en las condiciones del medio.

De todo ello parece deducirse que la diapausa y la regeneración son dos procesos indisociables y probablemente sometidos a un mismo determinismo endocrino.

Parece ser que no todos los Lumbrícidos son capaces de regenerar la cola. GATES (1950) ha señalado que el género Lumbricus es incapaz de regenerar los segmentos caudales amputados. MICHON (1954) y más tarde AVEL (1959) llegan también a esta misma conclusión. La diapausa ha sido observada sólomente en unos pocos géneros: Allolobophora (AVEL, 1929); MICHON, 1954); Eophila (BOULOT y GALLISSIAN; 1960) y en algunos Megascolecidos y Glossoscolecidos (GATES, 1941, 1948). Estas lombrices capaces de diapausa son designadas por MICHON (1954) como especies "anfodínamas".





87

MATERIAL Y METODOS DE TRABAJO

---

## MATERIAL Y METODOS DE TRABAJO

---

### I. MATERIAL.

El material biológico usado en este trabajo ha sido la especie Allolobophora caliginosa (Sav) y, principalmente la especie Allolobophora molleri (Rosa), pertenecientes, ambas a la familia Lumbricidae, Orden Oligochaeta, Clase Clitellata y tipo Annelida.

Para su clasificación hemos seguido las claves de determinación de especies de la Península Ibérica, elaboradas por el Dr. ALVAREZ (1971), en su Tesis Doctoral.

#### A. molleri (Rosa).

Es una lombriz de tierra bastante común, fácil de recolectar a lo largo de todo el año en estado juvenil. Sin embargo, en estado adulto, con clitelo, es decir, en período de madurez sexual, sóloamente se puede encontrar durante poco más de un mes, principalmente en Julio. Es un buen material para trabajos experimentales en los que se requieran gran cantidad de ejemplares, puesto que pueden ser obtenidas con facilidad en casas comerciales.

Este Oligoqueto terrícola tiene una coloración verdo-

sa, intensificándose hacia los extremos donde toma un color verde oscuro. La parte anterior es más gruesa que la posterior.

El prostomio es epilóbico. Cada segmento del cuerpo, menos el prostomio y el primer segmento, lleva ocho cerdas o quetas pareadas. El clitelo, propio del adulto, es una hinchazón glandular de la epidermis, de color más blanquecino, y se extiende desde el segmento 48 al segmento 59, es decir 11 o 12 segmentos, aunque hemos podido comprobar que hay una gran variabilidad en cuanto al comienzo y el final del mismo, así como del número de segmentos que comprende. Los tubérculos pubertarios están en los segmentos 50-57. En el segmento 15 se observan unas aberturas ventrolaterales, en forma de ojal, con los labios glandulares moderadamente gruesos, que son los poros genitales masculinos, que afectan ligeramente a los segmentos contiguos, o sea, al segmento 14 y 16.

Según ALVAREZ (1971), el número de segmentos del cuerpo oscila entre 150 y 210, aunque también la variabilidad de estos números es enorme, según hemos podido observar.

El material ha sido recogido en Madrid, en las riberas del Manzanares, en terrenos fangosos, encontrándose tanto más profundo cuánto más alejado está de la orilla, ya que esta especie necesita bastante humedad. Son lombrices muy activas y viven en terrenos con una proporción de materia orgánica superior al 3%.

Nosotros hemos encontrado a la A. mollerii siempre asociada a Eisenia foetida y Eisenia veneta, ésta última en menor

proporción. La separación de las especies se hace de un modo natural, por sí sola; para ello basta con dejarlas durante 24-28 horas en absoluto reposo. Las Allolobophora más lucífugas, quedan en el fondo buscando una mayor oscuridad; todas las Eisenia quedan más en la superficie.

A. caliginosa (Sav).

Esta lombriz la podemos encontrar en período clitelar en primavera y otoño, aunque su época de reproducción masiva es ésta última.

Su coloración es parda, amarillenta o gris. El prostomio es epilóbico y las quetas pareadas. El clitelo se extiende desde el segmento 27 o 28 al 34 o 35. Los tubérculos pubertarios son dos pares en los segmentos 31 y 33 o forman un todo continuo desde el segmento 31 al 33 o 34. El número de segmentos del cuerpo oscila entre 104 a 248. Esta especie se adapta con facilidad a los distintos ambientes (ALVAREZ, 1971). El material para nuestro trabajo ha sido recogido en los terrenos de la Ciudad Universitaria de Madrid.

Las lombrices, una vez recogidas, son llevadas al laboratorio. Se lavan bien con agua desclorada para quitarles toda la tierra que traen consigo. Se dejan en un recipiente durante un par de días para que vacíen su intestino, quedando así limpias de tierra y en condiciones adecuadas para la experimentación. El número de lombrices con el que hemos experimentado ha sido de 1.650 ejemplares aproximadamente.

## II. MÉTODOS DE TRABAJO.

El trabajo realizado en el Laboratorio se ha separado en dos partes:

- A) Microscopia óptica y electrónica.
- B) Análisis experimental del proceso de regeneración.

### A) Microscopia óptica y electrónica.

Para el estudio al microscopio óptico, realizamos las siguientes operaciones:

#### 1) Fijación del material:

Es sin duda una etapa fundamental en el estudio histológico; por ello, las piezas fijadas fueron de A. molleri y A. caliginosa en perfectas condiciones de vitalidad, recién traídos del campo.

Los fijadores utilizados, así como el tiempo de fijación fueron los adecuados al método de tinción que posteriormente íbamos a realizar.

Las fijaciones las realizamos a temperatura normal de laboratorio (18º-20ºC). El líquido fijador lo renovamos a los pocos minutos de haber comenzado la fijación (15-20 min).

#### 2) Inclusión:

Para las distintas inclusiones que realizamos hemos

usado parafina tipo MERCK especialmente purificada y de punto de fusión elevado (58°C).

Como el material a incluir ha de estar totalmente deshidratado, lo sometemos a unos sucesivos baños de alcohol de creciente concentración, de 30 min. cada uno, hasta llegar al alcohol absoluto; luego lo pasamos por dos o tres baños de tolueno, de 15 min. de duración cada uno de ellos, pues más tiempo endurece bastante los tejidos. Después, procedemos a la inclusión en un primer baño de parafina fundida, durante 24 y aún 47 horas, en estufa a 48°C; a continuación un segundo baño durante un tiempo variable entre 4 y 48 horas, igualmente en estufa a 48°C; a veces hacíamos un tercer baño de 4 horas y por último, realizamos la inclusión definitiva en parafina limpia.

### 3) Obtención de cortes:

Los bloques, después de orientados, fueron cortados en un microtomo de tipo JUNG. Se hicieron cortes transversales de 5, 7 y 10 micras. Luego se procedió a su extensión y fijación sobre el portaobjetos, al que se le había puesto un poco de albúmina glicerinada para evitar que los cortes se despegaran. A los cortes se les hace flotar sobre una capa de agua destilada encima de una plancha caliente (50°C). Una vez pegados, se les escurre el agua y se dejan

en la estufa a 38º C, durante 24 horas. Antes de comenzar la etapa siguiente de la tinción, se elimina la parafina de los cortes por el procedimiento normal de pasar las preparaciones por la serie de toluenos y alcoholes de concentraciones decrecientes hasta la hidratación total en agua destilada.

#### 4) Tinción:

Fueron varios los métodos ensayados, unos generales topográficos, que nos permitieron reconstruir perfectamente la disposición y situación de los centros nerviosos anteriores y localizar y reconocer las distintas clases de células nerviosas; otros fueron tinciones específicas para detectar los productos de neurosecreción.

#### a) Métodos Generales:

Entre las coloraciones topográficas la más usada por nosotros ha sido el Azan de HEIDENHAIN o método del Azocarmín-Azul de Anilina; es un método de bastante complejidad y que requiere una fijación excelente. Como fijador hemos usado el líquido de Bouin. La técnica que seguimos fue la descrita por GABE (1968). Como colorante usamos el Azocarmín G. La diferenciación bajo control del microscopio, la hemos tenido



que hacer rápidamente pues enseguida los cortes teñidos per  
dían el color.

b) Coloraciones específicas de la neurosecreción:

Aunque hemos utilizado en nuestro trabajo varias técnicas, sólo describiremos aquellas con las que hemos obtenido unos resultados más positivos y hemos introducido alguna variante en cuanto a los tiempos de tinción.

Los métodos que hemos usado son:

a) Método original de GOMORI (1941) o método de la Hematoxilina-Crómico-Floxina (MARTOJA, 1970). Como fijador empleamos el líquido de Bouin.

Los pasos que seguimos fueron los siguientes:

- 1º. Desparafinamos e hidratamos según rutina.
- 2º. Postfijación sobre el portaobjetos con Bouin cromado durante 24 horas a 37°C.
- 3º. Lavado en agua corriente hasta la decoloración de los cortes (10 minutos aproximadamente).
- 4º. Oxidación con la mezcla de GOMORI hasta que adquieren una coloración parda (2 minutos aproximadamente).
- 5º. Después de un rápido lavado en agua, se decoloran con bisulfito sódico (unos 2 minutos). Luego se lavan muy bien durante 5 minutos.
- 6º. Tinción con Hematoxilina crómica durante casi una hora.

- 7º. Lavado con abundante agua destilada.
- 8º. Diferenciación bajo el microscopio con alcohol clorhídrico (1 o 2 minutos).
- 9º. Lavado en agua corriente hasta que los cortes azuleen.
- 10º. Tinción con Floxina (de 1 a 5 minutos) y lavado rápido en agua destilada.
- 11º. Tratamiento con ácido fosfotúngstico al 5% durante 2 minutos.
- 12º. Lavado con alcohol de 70º, 90º y absoluto. Montaje.

Los resultados fueron muy buenos.

- b) Método de GOMORI (1941) con modificación de CAMERON y STEELE (1959). Es una tinción simplificada de aldehído-fucsina para células neurosecretoras.

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- 1º. Desparafinamos e hidratamos según rutina.
- 2º. Oxidamos con la mezcla GOMORI (1941) hasta que los cortes toman una coloración parda (3 minutos aproximadamente).
- 3º. Lavado en bisulfito sódico al 2,5% hasta que desaparezca el permanganato (unos 2 minutos).
- 4º. Lavado en agua destilada.
- 5º. Paso por el alcohol de 30º y alcohol de 70º (dos veces). (Este paso es muy importante).
- 6º. Teñimos con la fucsina-paraldehído, durante 5 minutos. La fucsina la preparamos según GABE (1953).

- 7º. Lavado de los portas con alcohol de 95º. Este paso también es importantísimo; hay que hacerlo rápidamente y deben quedar muy lavados en el alcohol. No se deben exponer los portas al aire mientras no se haya quitado el exceso de tinte, para evitar los precipitados.
- 8º. Paso por otro baño en alcohol de 95º hasta quitar el exceso de tinción.
- 9º. Pasamos por los alcoholes de 70º y 30º hasta llegar al agua.
- 10º. Contrastamos con la mezcla de HALMI durante unos 60 segundos.
- 11º. Lavado con el alcohol de 95º.
- 12º. Lavado dos veces con alcohol absoluto.
- 13º. Aclarado con tolueno. Montaje con bálsamo.

Los resultados obtenidos fueron muy positivos.

#### Microscopia electrónica.

Para el estudio ultraestructural hemos utilizado ganglios cerebroides recientemente extirpados de Allolobophora caliginosa en condiciones óptimas.

La microscopía electrónica se realizó en tres fases:

- Fijación con glutaraldehído y post-fijación con ácido ósmico.
- Inclusión en Araldita.
- Preparación y observación de rejillas.

Fijación:

Para la fijación se preparan tres soluciones madre:

- Solución A Fosfato monosódico al 2,26%.
- Solución B Hidróxido sódico al 2,52%.
- Solución C Glucosa al 5,4%.

Con estas soluciones base se preparan:

Milloning-Solución A..... 41,5 ml.

" B ..... 8,5 ml.

De esta mezcla se separan 5 ml. y se reemplazan por 5 ml. de Solución C. Se añaden además 0.5 ml. de Cloruro cálcico al 1%, para reforzar las membranas.

Para la fijación en Milloning sólo, no se añade la solución C.

Milloning-Glutaraldehído:

4 volúmenes de Milloning sin glucosa.

1 volumen de glutaraldehído al 25%.

Desarrollo de la Fijación:

- 1) Se fijan los ganglios supraesofágicos en Milloning-Glutaraldehído en nevera durante 4 horas.
- 2) Se cambia el medio por Milloning con glucosa y  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  con tetróxido de osmio al 2%, durante dos horas.

Inclusión:

1º día: 1) Lavado en agua destilada.

2) Acetona al 30% en agua destilada, 30 min.

3) Acetona al 50%, 30 min.

4) Acetona al 70%, 30 min.

5) Acetona al 70% más contraste, 12 horas.

2º día: Se ponen las cápsulas en estufa a 37º C.

1) Acetona al 90%, 30 min.

2) Acetona al 100%, 30 min.

3) Acetona con sulfato de cobre, 30 min.

4) Oxido de propileno, 1 hora. Se cambia dos veces.

5) Oxido de propileno más Araldita I en proporción 3:  
1, 2 horas.

6) Oxido de propileno más Araldita I (1:3), 12-24 ho-  
ras.

3º día: 1) Araldita I (estufa a 50ºC 2 horas).

2) Araldita I (estufa a 50ºC, 12-24 horas).

4º día: 1) Araldita II (estufa a 50ºC, 1 hora).

2) Araldita II (estufa a 50ºC, 1 hora).

Las muestras se pasan a cápsulas de gelatina secas que se llenan con Araldita II y se ponen a 70ºC durante 48 horas para el endurecimiento.

- Araldita I:

Componente B-Azul-Endurecedor. 10 ml.

Componente D-Verde-Plastificante. 0.15 ml.

Componente A/M-Rojo-Resina epoxi. 10 ml.

- Araldita II:

Componente B-Azul-Endurecedor. 10 ml.

Componente C-Amarillo-Acelerador. 0,4 ml.

Componente D-Verde-Plastificante. 0.15 ml.

Componente A/M-Resina epoxi. 10 ml.

Preparación y observación de rejillas:

Se tallaron pirámides en las rejillas. Se realizaron cortes finos de 2 micras los cuales se observaron en un microscopio de contraste de fase. A continuación se hicieron los cortes ultrafinos con un ultramicrotomo. El espesor aproximado fue de 1000 Å. Se utilizaron cuchillas de vidrio y rejillas de cobre. Los cortes se contrastaron con Citrato de plomo.

B) Análisis experimental del proceso de regeneración.

Los trabajos experimentales sobre regeneración caudal los hemos llevado a cabo fundamentalmente en Allolobophora molle-  
ri. Estos trabajos los podemos agrupar en varios apartados:

- a) Papel de los ganglios cerebroides.
- b) Papel del ganglio subfaríngeo.
- c) Papel de los centros nerviosos anteriores y de la cadena nerviosa ventral.

d) Influencia de los factores ambientales.

Con el fin de realizar una experimentación totalmente controlada, tuvimos que tener en cuenta, además, el estado del animal, es decir, si era joven, preclitelar o clitelar, así como el nivel de amputación caudal.

Los ejemplares utilizados en nuestro trabajo han sido sometidos a los siguientes procesos y operaciones:

- 1) Control de peso.
- 2) Control de la humedad.
- 3) Control de la temperatura.
- 4) Control de la luz.
- 5) Anestesia.
- 6) Extirpación de ganglios cerebroides.
- 7) Extirpación del ganglio subfaríngeo.
- 8) Decapitación.
- 9) Injertos o trasplantes de cerebro.
- 10) Cortes de cadena nerviosa.
- 11) Amputación caudal.

Cualquier tipo de operación se ha realizado siempre bajo la lupa colocando a la lombriz en una placa patri cuyo fondo ha sido recubierto con plastilina. Se fija ella mediante unos puentes metálicos.

Todas las lombrices experimentales y controles son mantenidas en ayuno y oscuridad hasta el final del experimento, siempre que éste no requiera otra cosa.

A continuación pasamos a describir cómo hemos realiza-

do cada uno de los procesos y operaciones a las que las lombrices han sido sometidas a lo largo del trabajo experimental.

1) Control de peso. Modo de hacerlo.

En la mayoría de nuestros experimentos hemos procedido a separar las lombrices en lotes de individuos con un peso aproximadamente igual. Antes de comenzar a pesar las lombrices son lavadas y puestas a evacuar para que vacíen completamente el intestino.

Las pesadas las realizamos en una balanza de precisión, tipo SAUTER y usamos como tara un erlenmeyer forrado de papel de aluminio para evitar la acción de la luz; la lombriz se seca ligeramente con papel de celulosa.

2) Control de la humedad.

Las lombrices que en nuestro experimento hemos considerado "en medio húmedo" estaban colocadas aisladamente en placa petri provistas de un papel de filtro y con 4 ml. de agua desclorada. Las lombrices "en sequedad" eran aquellas colocadas en placas petri, provistas de un papel de filtro simplemente humedecido con agua desclorada.



3) Control de la temperatura

Cuando hablamos de temperatura normal de laboratorio nos referimos a una temperatura de  $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Los experimentos realizados "en frío" tienen lugar en el laboratorio a temperatura ambiente de  $13^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , o en cámara de frío a  $10^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

4) Control de la luz.

Las lombrices "en oscuridad" están tapadas con un paño negro. Las dejadas "en luz" pueden estar sin tapar o bajo la luz de una bombilla encendida día y noche, pero suficientemente alejada para evitar el calor.

5) Anestesia.

Previamente a la operación, la lombriz es anestesiada con etanol al 10% en agua desclorada. La pasamos sucesivamente por dos pocillos que contienen el anestésico, manteniéndola 2-3 minutos en cada uno de ellos. Después de operadas las lombrices han de ser bien lavadas para que el anestésico deje de actuar sobre ellas. Cada lombriz se coloca en una placa petri numerada y con un papel de filtro y unos 4 ml. de agua desclorada.

6) Extirpación de los ganglios cerebroides.

Se practica un corte longitudinal en el 2º y 3º segmentos anteriores. Se hace la incisión por la parte dorsal y algo lateralmente (para evitar la rotura del vaso sanguíneo dorsal y la excesiva salida de sangre). (Fig. 2).

Se utilizan para la descerebración tijeras oftálmicas, y unas pinzas finas para la extracción del cerebro. Una vez localizados y sujetos los ganglios cerebroides, se cortan los conectivos perifaríngeos que unen estos ganglios con el ganglio subfaríngeo colocado en posición ventral. La recuperación es rápida y buena.

7) Extirpación del ganglio subfaríngeo.

La lombriz, se fija a la plastilina con la parte ventral hacia arriba. Hacemos un corte en el 3º y 4º segmentos, ligeramente desviada hacia la parte lateral derecha, con unas finas tijeras oftálmicas. Localizado el ganglio, se sujeta con las pinzas y cortamos los conectivos perifaríngeos, así como la cadena nerviosa (es fácil extirpar conjuntamente el 1º, 2º y a veces el 3º par de ganglios de la cadena nerviosa).

La recuperación de las lombrices desganglionadas es buena, aunque la mortalidad es algo mayor que en el proceso de descerebración.

- -

8) Decapitación.

Se realiza cortando los 6-7 segmentos anteriores de la lombriz. Se sigue el mismo proceso de lavado que en las operaciones anteriores.

9) Injertos o trasplantes de cerebro.

Consiste la operación, como su nombre indica, en injertar el cerebro de una lombriz (donante) en la cavidad celómica de otra lombriz (receptora), para lo cual colocamos las dos lombrices, sobre la plastilina que recubre el fondo de una placa petri, fijándolas mediante los puentes metálicos. En la lombriz receptora hacemos un corte dorsal y un poco lateral en los segmentos 4 y 5. Después, en la lombriz donante, extirpamos el cerebro como indicamos anteriormente, y con la ayuda de las pinzas, y siempre bajo la lupa, tratamos de meterlo lo más profundamente posible en la lombriz receptora. Hay que asegurarse bien de que este cerebro no es rechazado por el animal.

10) Cortes de cadena nerviosa ventral.

Consiste en hacer dos cortes no muy profundos por la parte ventral de la lombriz a dos niveles distintos, esto es, antes y después de la zona clitelar.

11) Amputación caudal.

Siempre la hemos realizado en último lugar, después de la extirpación de cualquiera de los centros nerviosos anteriores. En nuestros experimentos hemos amputado los 40-50 últimos segmentos del cuerpo.

406

## RESULTADOS Y DISCUSION

---

## I.- ESTUDIO OPTICO Y ULTRAESTRUCTURAL.

### 1.- Histología de los ganglios cerebroides.

Hemos realizado el estudio óptico de los ganglios cerebroides de A. molleri y A. caliginosa. En nuestro trabajo utilizamos varias técnicas de tinción, en las cuales, las más representativas han sido la original de GOMORI, el Azan de HEIDENHAIN y la tinción simplificada de aldehído-fucsina de CAMERON y STEELE, como ya expusimos en el apartado correspondiente.

En A. molleri adulta en período no clitelar, los ganglios supraesofágicos poseen escasa afinidad tintorial por el Azan (Fig. 4). Podemos observar no obstante que, rodeando al neuropilo central, existe una corteza de pericoriones neurosecretoras. Las células neurosecretoras situadas en la superficie de la zona dorsal y posterior del cerebro son pequeñas, numerosas y de forma irregular y, a nuestro parecer, podrían corresponderse con las llamadas "células a" por HUBL (1953, 1956 a, b) en A. terrestris f. longa. Lumbricus terrestris y Eisenia foetida; con las "células a" de HERLANT-MEEWIS (1955) de Eisenia; y con las "células a" de ZAHID (1977) A. caliginosa y A. rosea. Por debajo de estas "células a" y colocadas más profundamente podemos observar otras más grandes, ovaladas y poco abundantes que quizás se corresponderían con las "células b" de ZAHID (1977), que presentan un núcleo

redondo en el que destaca un grueso nucleolo. El protoplasma aparece fuertemente teñido por el Azan. También podemos encontrar células neurosecretoras bipolares en la región intercerebral que, probablemente podrían equipararse a las "células b" de HUBL y a las células neurosecretoras bipolares de ZAHID. Por último, podemos ver células fusiformes agrupadas cerca de los conectivos laterales que serían semejantes a las células fusiformes de ZAHID y a las "células b" de HERIANT-MEEWIS.

En A. molleri adulta en período clitelar, los ganglios cerebroides tienen, sin embargo, una gran afinidad por la fucsina-paraldehído de CAMERON y STEELE. Estas células teñidas intensamente de violeta, se encuentran esparcidas por todo el ganglio, principalmente por la superficie, aunque también se ven abundantes células teñidas por la zona profunda de los mismos, como se observa en la Fig. 5, que corresponde a un corte bastante posterior del cerebro. Sin embargo, en la Fig. 6 donde vemos un solo ganglio supraesofágico, que pertenece a un corte muy anterior del mismo cerebro, observamos que no existen apenas células neurosecretoras teñidas.

Las células fucsínófilas y Gomori positivas del cerebro poseen un pericarion piriforme, densamente coloreado, en el que destaca un grueso y redondo núcleo excéntrico y de color amarillento que contiene acumulos de cromatina dispersos (Fig. 7).

A nuestro parecer estas células serían semejantes a las "células a" observadas por HUBL en E. foetida y A. terrestris f. longa; por HERIANT-MEEWIS en E. foetida; por SAUSSEY en

A. icterica y a las células peptidérgicas "tipo 2" de FERRER DE MORAIS y cols. (1979) de Eisenia, es decir, células de la sexualidad que aparecen en la época de la pubertad e intervienen con su neurosecreción en el proceso reproductivo.

En A. caliginosa, con clitelo, en período de madurez sexual, las células neurosecretoras de los ganglios cerebroides, que se tiñen de rojo con el Azan (como las "células a" de HUBL para E. foetida), se reúnen formando dos grupos perfectamente señalados: uno en la porción superior y dorsal del cerebro, en la zona intercerebral y otro grupo cerca de los conectivos laterales. (Fig. 8). Estas células presentan un pericarion ovalado, teñido de rojo con un gran núcleo claro y de forma ovalada o redondeada, generalmente excéntrico, en el que destaca de un modo muy patente uno, dos o más nucleolos fuertemente teñidos de rojo. (Fig. 9).

Como fácilmente se observa en todas las fotografías, el cerebro está rodeado de una cápsula conjuntiva que delimita perfectamente cada ganglio cerebroide y que se tiñe intensamente de azul con el Azan o de verde azulado con la fucsina-paraldehído de CAMERON y STEELE. Estas fibras calógenas también parecen separar las células neurosecretoras del neuropilo central de los ganglios. (Fig. 9 y 15).

## 2.- Histología del ganglio subfaríngeo y ganglios de la cadena ventral.

En un corte transversal realizado en el ganglio ~~infra~~ esofágico de A. molleri adulta pero sin clitelo, teñido





Azan, podemos ver gran número de células neurosecretoras con una fuerte afinidad tintorial, localizadas principalmente en la superficie ventrolateral del ganglio (Fig. 10). Estas células poseen un pericarion ovalado o piriforme bastante grande y un gran núcleo redondo y central en el que se halla muy patente el nucleolo. Los axones neurosecretorios de estas células se dirigen hacia el neuropilo de cada ganglio.

En la Fig. 11 podemos observar otro corte transversal del ganglio subfaringeo de A. molleri joven pero teñido con Gomori original. Este corte corresponde a una porción bastante anterior del ganglio; sin embargo, en un corte más profundo del mismo, (Fig. 12) vemos que las células neurosecretoras se distribuyen por todo el ganglio, como también vimos ocurría en el cerebro (Fig. 5).

Las células neurosecretoras del ganglio subfaringeo, con bastante afinidad por la fucsina-paraldehído y por el Azan, podrían ser, las responsables de la estimulación de la regeneración caudal. A nuestro parecer podrían equipararse con las "células U" de HUBL (1953, 1956 a, b) de Lumbricus, y con las "células "c", "d" y "e" de ZAHID (1977), de A. caliginosa.

En A. molleri clitelada, en un corte transversal del ganglio infraesofágico, (Fig. 13), vemos células neurosecretoras debilmente teñidas con la fucsina-paraldehído de CAMERON y STEELE.

Esto parece confirmar la hipótesis de que la neurosecreción de las células de la sexualidad del cerebro inhibe la actividad neurosecretora de las células subfaringeas que intervendrían en el proceso de la regeneración, impidiendo

así la formación de una nueva cola. También, en la Fig. 14, que corresponde a un corte transversal de la región cefálica de A. molleri clitelada, se puede observar conjuntamente a los ganglios supra e infraesofágicos; se ve claramente la abundancia de células nerviosas cerebrales intensamente teñidas de morado por la fucsina-paraldehído, o sea, llenas de neurosecreción, y la casi ausencia de sustancia neurosecretada en el ganglio subfaringeo.

En cuanto a los ganglios de la cadena ventral podemos ver, en un corte transversal de la misma, de A. molleri joven, sin clitelo teñida con Azan (Fig. 15) y de A. molleri clitelada teñida también con Azocarmin de Heidenhain, (fig. 16), como en estos ganglios, las células neurosecretoras, escasamente coloreadas, se acumulan por la zona superficial, sobre todo, cerca de los conectivos laterales y parte ventral de los ganglios. De acuerdo con CHAPRON (1972) y MARCEL (1972 c), estas células grandes, de citoplasma piriforme, gran núcleo redondo y excéntrico y provistos de un nucleolo muy patente, serían activadas por el estímulo producido al ser amputada a la lombriz la región caudal.

Tanto el ganglio subfaringeo como los ganglios de la cadena nerviosa ventral poseen una envoltura conjuntiva semejante a la del cerebro.

En resumen, en A. molleri adulta pero sin clitelo el cerebro presenta células neurosecretoras con escasa actividad, agrupadas preferentemente en la parte superior y dorsal de los ganglios, así como en la zona intercerebral. (Fig. 4); el

ganglio subfaringeo, sin embargo, presenta abundantes células con neurosecreción en la parte ventral y cerca de los conectivos laterales (Fig. 10); en los ganglios de la cadena ventral las células neurosecretoras están debilmente teñidas pero se ven gran cantidad de células que, probablemente, entrarán en funcionamiento durante la regeneración caudal. (Fig. 15).

En A. mollereri adulta, con clítelo, el cerebro presenta gran número de células neurosecretoras con gran afinidad tintorial y dispersas por toda la superficie de los ganglios (Fig. 5). En el ganglio subfaringeo las células neurosecretoras, con escasa actividad, están situadas principalmente en la porción intercerebral y zona ventral del mismo, así como en la proximidad de las comisuras laterales (Fig. 13); por último, los ganglios ventrales, presentan igualmente células debilmente fucsínófilas, pero que podrían activarse cuando la lombriz sufriera una amputación de la cola (Fig. 16).

En cuanto a la especie A. caliginosa clitelada vemos que las células neurosecretoras cerebrales se agrupan de modo distinto que en el cerebro de A. mollereri (Fig. 8 y 5 respectivamente) lo que hace pensar como si la A. mollereri fuera más primitiva en la escala evolutiva que la A. caliginosa, cuyas células neurosecretoras tienen una distribución más parecida a la de los Insectos y otros animales Invertebrados más evolucionados.

### 3.- Ultraestructura.

Ha sido estudiada por nosotros la ultraestructura de las células neurosecretoras en el cerebro de A. caliginosa clitelada. Basadas en estos estudios subdividimos las células neurosecretoras en diferentes tipos:

Tipo 1.- Estas células forman una capa superficial justamente por debajo de la cápsula neural. Ellas son células pequeñas, de 5 o 6  $\mu$ ; tienen un gran núcleo frecuentemente de bordes irregulares (Fig. 17). Hay un prominente nucleolo. La cromatina es electrón denso y abundante y dispersa en el núcleo, pero también puede ser encontrada en relación con la membrana nuclear y asociada con el nucléolo. Vesículas densas y vesículas transparentes a los electrones pueden ser encontrados en la misma célula. El diámetro de los gránulos oscila entre 2.500 a 3.000 Å. Las mitocondrias poseen crestas orientadas en forma radiada.

Tipo 2.- Estas células también forman una capa superficial inmediatamente por debajo de la capsula neural. La situación de las células en el cerebro es posterior a la de las células "tipo 1" y cerca de la línea media. La célula tiene un gran núcleo grande y un gran nucléolo.

Las vesículas son transparentes a los electrones, (Fig. 18), ovaladas, y tienen 3000-3200 Å de diámetro. Las mitocondrias son escasas y pequeñas. Los gránulos con frecuencia lle

nan el citoplasma de la célula. Se puede ver retículo endoplásmico tortuoso en la periferia de la célula.

Tipo 3.- Estan localizadas postero-lateralmente. Son aproximadamente de  $28\mu$  de diámetro y muy pocas en número. Las vesículas con material denso a los electrones son más pequeños ( $800-1200 \text{ \AA}$ ). Estas células están situadas más profundamente que las células de "tipo 1" (Fig. 19). Es probable que estén en período de secreción activa cuando la lombriz está en período clitelar.

Tipo 4.- Son también células grandes ( $16-18\mu$ ). Forman una capa de células bipolares justamente por debajo de las células de tipo 1, 2 y 3. El núcleo es oval con cromatina dispersa y sin nucléolo. Los gránulos neurosecretados forman grupos entre los que existen cisternas de retículo endoplásmico rugoso, numerosos ribosomas y polisomas (Fig. 20 y 21). Las mitocondrias son relativamente escasas y pequeñas. Los gránulos miden de  $1200-1500 \text{ \AA}$  de diámetro y tienen la apariencia de esferas que poseen un contenido granular rodeado de una zona más clara, y por una membrana. Estas células se encuentran dorsalmente entre las células de "tipo 3", en una zona que se extiende posteriormente y hacia los laterales del cerebro.

Tipo 5.- Son células también grandes de unos  $23\mu$ ; los núcleos son ovalados con un gran nucléolo, (Fig. 22), cerca de la membrana nuclear. La cromatina es muy densa a los elec-

trones y está relacionada con la membrana nuclear y asociada con el nucléolo. Las mitocondrias son grandes y con crestas irregularmente dispuestas. El retículo endoplásmico granular está normalmente situado en la periferia y el complejo de GOLGI está bastante desarrollado; con vacuolas y vesículas secretoras. Los gránulos de neurosecreción tienen de 600 - 1200 Å, limitados por una membrana y granulados.

Nosotros también hemos encontrado otros tipos de células cerebrales con vesículas neurosecretoras conteniendo grandes corpúsculos densos en su interior; otras contienen vesículas vacías y a veces con un contenido homogéneo denso a los electrones. ZAHID (1977) clasificó las células neurosecretoras de A. caliginosa sobre la base de microscopía óptica, en células de "tipo a", que ocupaban posiciones dorsales y laterales en la región posterior del cerebro. Las células de "tipo b" están presentes en pequeño número. La mayoría de las "células b" son ovales y sus inclusiones neurosecretadas citoplásmicas tienen una moderada a fuerte afinidad por la fucsina-paraldehído. Por último existen (ZAHID, 1977) células bipolares. Ellas podrían ser similares a las células de "tipo 3" de FERRER DE MORAIS (1979).

Los resultados obtenidos de nuestro estudio parecen apoyar la hipótesis de la existencia de dos tipos de "células a" que nosotros denominamos "tipo 1" y "tipo 2", que se encuentran situadas inmediatamente debajo de la cápsula conjuntiva. Las células de "tipo 1" se encuentran en una fase de gran actividad secretora durante la madurez sexual, mientras que los

de "tipo 2" parecen estar en una fase de almacenamiento y podrían estar bloqueadas en la madurez sexual.

También de los resultados obtenidos en nuestros trabajos parece deducirse que el "tipo 3" de célula neurosecretora podría ser la denominada "célula b" de ZAHID. Estas células aparecerían en la pubertad y parecen necesarias para la espermatogénesis normal.

Por otra parte las células "tipo 4" y "tipo 5" descritas por nosotros corresponden probablemente con las células bipolares de ZAHID. Se piensa que su papel no es producir una hormona de crecimiento o metabólica, sino mantener la actividad de los genitales durante el período de la puesta.

Así pues nosotros conocemos ahora los aspectos ultraestructurales de cada célula de los ganglios cerebroides de A. caliginosa. Estos resultados nos ayudarán a seguir con más precisión su actividad secretora durante el crecimiento, reproducción y regeneración. La extirpación del cerebro en A. caliginosa impide la persistencia del clitelo y facilita los procesos de regeneración. Esto indica el origen en el cerebro de influencias sobre la reproducción y regeneración. Ulteriores estudios son necesarios en orden a clarificar los mecanismos implicados en estos fenómenos.

## II.- ANALISIS EXPERIMENTAL DEL PROCESO DE REGENERACION.

### 1.- Injertos de cerebro y corte de cadena nerviosa.

Antes de entrar de lleno en el problema objeto de nuestro estudio, esto es, en el papel que juegan los centros nerviosos anteriores (ganglios supra e infraesofágicos y cadena nerviosa ventral) en la regeneración caudal de Allolobophora molleri, lo primero que nos preguntamos era si la regeneración se producía por vía nerviosa o por vía humoral. Para comprobarlo realizamos dos tipos de experimentos: a) extirpación de ganglios cerebroides e injertos de cerebro; b) corte de la cadena nerviosa ventral.

Experimento "a": extirpación de ganglios cerebroides e injertos de cerebro.- Utilizamos un lote de 22 lombrices recogidas en el mes de Octubre, muy jóvenes, de tamaño pequeño y peso entre 110-150 mg. Las descerebramos y amputamos de 40-50 segmentos caudales, de la forma descrita en el apartado de Material y Métodos.

Cada una de ellas es mantenida aisladamente en una placa petri, en ayuno, oscuridad, humedad y a una temperatura ambiente de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

A los 22 días de la operación no había regenerado ninguna lombriz. A los 35 días aparecen tres lombrices con regeneración caudal. Sólo pues regeneran el 13.6% (Tabla I).



Dos meses después, a un conjunto de 15 lombrices del experimento anterior, que no habían regenerado la cola (aunque quizá ya habrían regenerado parte o todo el cerebro), les injertamos un nuevo cerebro procedente de otro lote de animales pequeños, de peso comprendido entre 100-135 mg. Al mismo tiempo les volvemos a quitar de 10 a 15 segmentos caudales para estimular la regeneración.

Después de 14 días regeneran la cola el 66,6% de aquellas lombrices a las que les ha sido implantado un nuevo cerebro, como también podemos ver en la Tabla I.

Este experimento nos demuestra que en el cerebro debe existir una sustancia de tipo hormonal que a través del líquido celómico y la sangre va a actuar directa o indirectamente sobre el blastema de regeneración dando lugar a la formación de una nueva cola. La regeneración caudal, por tanto, se produce por vía hormonal, ya que al extirpar previamente el cerebro hemos roto la conexión nerviosa de éste con el ganglio subfaríngeo y cadena nerviosa ventral. Por otra parte también se demuestra que la implantación de los ganglios cerebroides puede hacerse en cualquier lugar y no requiere un sistema nervioso intacto.

Experimento "b": Corte de la Cadena nerviosa.- A un lote de 15 lombrices jóvenes, sin clitelo, recogidas en el mes de Febrero, cuyo peso medio es de 225 mg., les seccionamos la cadena nerviosa mediante dos cortes en la región ventral, uno anterior y otro posterior a la zona del futuro clitelo. Después, les amputamos de 40-50 segmentos caudales. Los resultados fueron

T A B L A I

A. molleri muy jóvenes. Comparación de porcentajes de regeneración caudal entre unas lombrices descerebradas y otras también descerebradas pero a las que posteriormente se les ha implantado un nuevo cerebro. Todas han sido amputadas de 40-50 segmentos caudales. N<sup>o</sup>= Número de lombrices; Pm= Peso medio de cada una de las lombrices en miligramos; %= Porcentaje de lombrices con regeneración caudal; ( )= Lombrices que han regenerado.

Tipo de operación	N <sup>o</sup>	Pm (mg)	Días después del experimento				
			14	18	20	22	35
lombrices descerebradas	22	130	0%	0%	0%	0%	13'6%
							(3)
lombrices descerebradas e injertadas de un nuevo cerebro.	15	120	66'6%	66'6%	66'6%	66'6%	66'6%
							(10)

de un 40% de lombrices con regeneración. Como controles usamos otro lote de 16 lombrices de 240 mg. de peso medio, recogidas el mismo día y en idénticas condiciones, a las que dejamos intactas y amputamos también 40-50 segmentos caudales. Obtuvimos un 31,2% con regeneración caudal. El hecho de que el porcentaje de regeneración fuese menor que el del lote experimental, creemos puede ser debido a que el estímulo en los animales experimentales es mayor que en los controles, al ser mayor también el daño sufrido en la operación (Tabla II).

Vemos pues, que al cortar la cadena nerviosa ventral rompemos, como en el caso anterior, la conexión nerviosa de los distintos segmentos entre sí y, por tanto, con los centros nerviosos anteriores. El 40% de animales que han regenerado nos demuestra también que la regeneración se produce por vía humoral.

De todo lo expuesto anteriormente podemos deducir que en los Oligoquetos terrícolas, cuyo cerebro está profundamente vascularizado, los productos de neurosecreción son liberados en el sistema circulatorio, como ya había observado HERLANT-MEEWIS (1956-1962), BERJON (1968) y BERJON y MEUNIER (1968); y la regeneración caudal, independientemente de que exista un camino a través de los nervios, es producida por vía hormonal.

## 2.- Importancia del grado de desarrollo de la lombriz en la regeneración caudal.

También a lo largo de nuestros experimentos nos pudimos dar cuenta de que la regeneración caudal, en individuos en idén

T A B L A II

A. mollerii. Comparación de porcentajes de regeneración caudal entre unas lombrices seccionadas de la cadena nerviosa ventral (experimentales) y otras intactas (controles), después de amputados de 40-50 segmentos caudales. N<sup>o</sup>= Número de lombrices; Pm= Peso medio de cada lombriz en miligramos; %= Porcentaje de lombrices con regeneración caudal. ( ): Lombrices que han regenerado.

Tipo de operación	N <sup>o</sup>	Pm (mg)	Días después de experimento		
			18	25	35
lombrices con cadena nervio sa seccionada (experimentales)	15	225	33'3% (5)	33'3% (5)	40% (6)
lombrices intactas (controles)	16	240	18'7% (3)	18'7% (3)	31'2% (5)

ticas condiciones experimentales, dependía del grado de desarrollo del animal, es decir, la capacidad para regenerar la cola era distinta según que la lombriz estuviera en estado juvenil, en estado preclitelar o en estado adulto con clitelo. Así vemos en la Tabla III que de un lote de 26 lombrices muy jóvenes, recogidas en el mes de Octubre, de peso medio de 130 mg., a las que habíamos dejado intactas cerebralmente pero amputamos de 40-50 segmentos caudales y colocado en condiciones óptimas, regeneran una nueva cola el 69,2% de ellas aproximadamente.

Más tarde, en los meses de Noviembre, Febrero, Marzo y Abril recogemos un gran lote de lombrices también jóvenes, pero algo más avanzadas en su desarrollo, a las que mantenemos a tres temperaturas distintas, en frío entre 13º y 17ºC; a temperatura ambiente de 20±2ºC y en estufa a 26ºC. Por lo demás las colocamos en idénticas condiciones experimentales que las anteriores. En la Tabla III podemos observar la importancia de la temperatura en la regeneración caudal, como más adelante comprobaremos nuevamente. A 20±2ºC regeneran el 56%.

Ya en los meses de Mayo y primeros días de Junio, nos hicimos con otro lote de 38 lombrices, en estado preclitelar, de peso medio de 222 mg., con un ligero esbozo de clitelo, a las que mantuvimos exactamente igual que las de los grupos anteriores. De éstas, aparecen con regenerado caudal el 48,3%.

Por último, recogimos un cuarto lote de 31 lombrices en estado adulto, con un clitelo bien desarrollado, de peso medio de 257 mg., en los meses de Junio (últimos días) y Julio. Lo mismo que a todas las anteriores les amputamos los

40-50 últimos segmentos y las colocamos en idénticas condiciones ambientales (Tabla III). Sólo un 34,5% del total de lombrices llegaron a formar un regenerado posterior (a pesar de que el calor de la época es un factor que estimula la regeneración, como veremos más adelante).

En esta Tabla fácilmente nos damos cuenta de que las lombrices intactas cerebralmente muy jóvenes son las que mayor capacidad tienen para regenerar la cola amputada (69,2%), siendo la velocidad de crecimiento de ésta también mayor. A medida que el animal avanza en su grado de desarrollo hacia la madurez sexual, estado preclitelar, la capacidad regenerativa va disminuyendo (48,3%) hasta hacerse muy escasa en las lombrices con un clitelo bien desarrollado (34,5%). También la velocidad de crecimiento del regenerado es mucho más pequeña.

### 3.- Papel de los ganglios cerebroides.

Con el fin de investigar cuál era específicamente la misión del cerebro en el proceso de regeneración caudal, sometimos un gran lote de lombrices muy jóvenes, preclitelares y clitelares a la operación de ser descerebradas y amputadas de 40-50 segmentos caudales (lombrices experimentales) y comparamos su comportamiento respecto a la forma de regenerar los últimos segmentos con otros lotes de lombrices en idénticas condiciones experimentales, pero dejadas intactas cerebralmente (lombrices controles). Los resultados se pueden ob-

T A B L A III

Comparación de porcentajes de regeneración caudal en A. moller en distinto grado de desarrollo y distintas temperaturas, después de amputados 40-50 segmentos caudales. N<sub>o</sub>= Número de lombrices; Pm= Peso medio de cada lombriz en miligramos. % = Porcentaje de lombrices con regeneración caudal. ( ) = Lombrices que han regenerado.

Grado de desarrollo	Temperatura	N <sub>o</sub>	Pm (mg)	Epoca	Rg (%)
Muy jóvenes	20 <sup>o</sup> ± 2 <sup>o</sup> C	26	130	Octubre	69'2% (18)
Jóvenes	13 <sup>o</sup> -17 <sup>o</sup> C	88	185	Nov-Feb.	17'4% (15)
	20 <sup>o</sup> ± 2 <sup>o</sup> C	55	171	Mar-Abril	56% (31)
	26 <sup>o</sup> C	15	201	Mar-Abril	66% (10)
Prelitelaes	24 <sup>o</sup> -26 <sup>o</sup> C	38	222	Mayo-Junio	48'3% (18)
Cliteladas	29 <sup>o</sup> -31 <sup>o</sup> C	31	257	Julio	34'5% (11)

servar en la Tabla correspondiente. (Tabla IV).

De la comparación de estos resultados deducimos que las lombrices, cuánto más jóvenes son, más necesitan del cerebro para poder regenerar los últimos segmentos amputados, de tal manera que los animales muy jóvenes descerebrados son incapaces de formar una nueva cola (19,3%). Pensamos pues que en el cerebro de estas lombrices podría existir un "factor hormonal", o "factor de crecimiento" (FC) imprescindible en las lombrices en edad juvenil para regular de alguna manera, la regeneración de los segmentos caudales. Este factor hormonal podría ser el producto de neurosecreción de las llamadas "células b", en ciertos lumbricidos, por HUBL (1953, 1956 a, b), las cuales "están siempre presentes y se activan grandemente después de la amputación de la cola, al comienzo de la regeneración".

### 3 a. Interacción Regeneración-Reproducción.

Por otro lado, nuestras experiencias nos llevaron a comprobar que las lombrices cuánto más adultas son, menos necesidad del cerebro tienen para regenerar los segmentos caudales, hasta tal punto que las lombrices intactas cliteladas, en plena madurez sexual, son las que menos capacidad regenerativa poseen (30,5%). Por el contrario, las lombrices descerebradas y provistas de un gran clitelo son las que regeneran la cola en mayor proporción (80%). Parece innegable una cierta interacción entre la regeneración y la madurez sexual, y que el cerebro juega un papel importante en estos procesos. (Tabla IV)



T A B L A IV

Papel de los ganglios cerebroides en la regeneración caudal de *A. molleri*. Comparación de porcentajes de regeneración caudal entre lombrices intactas (controles) y descerebradas (experimentales), a diferentes temperaturas y después de seccionados 40-50 segmentos caudales. N°= Número de lombrices; Pm= Peso medio de cada lombriz en miligramos. Rg%= Porcentaje de lombrices con regeneración caudal. ( )= Lombrices que han regenerado.

Grado de Desarrollo	Tipo de Operación	Tempra.	N°	Pm (mg)	Rg (%)
Muy jóvenes	Intactas	20°±2°C	26	130	69'2% (18)
	Descerebradas	20°±2°C	38	126	19'3% (7)
Jóvenes	Intactas	13°-17°C	16	240	19% (3)
		20°±2°C	12	194	75% (9)
		26°C	15	201	66% (10)
	Descerebradas	13°-17°C	16	211	18'7% (3)
		20°±2°C	12	213	25% (3)
		26%	18	155	77% (14)
Preclitelaes	Intactas	24°-26°C	28	223	47'5 (13)
	Descerebradas	24°-26°C	23	236	73% (17)
Cliteladas	Intactas	29°-31°C	13	259	30'5% (4)
	Descerebradas	29°-31°C	15	269	80% (12)

GOLDING (1974 b) en sus trabajos sobre Nereis considera que una única hormona podría estar implicada en la regeneración caudal y en la reproducción sexual, de tal manera que la retirada de uno de estos fenómenos permitiría el desarrollo del otro. Esta teoría explicaría el hecho expuesto anteriormente de que, así como las lombrices juveniles intactas cerebralmente regeneran en un 69,2%, a medida que empiezan a prepararse para la reproducción, (estado preclitelar), la capacidad de regeneración caudal es menor (47,5%) llegando a hacerse mínima (30,5%) cuando los animales han alcanzado completamente la madurez sexual, (estado clitelar). Sin embargo, a nuestro modo de ver, este proceso podría explicarse de la siguiente manera: un factor hormonal existente en el cerebro, es liberado en el momento que el animal sufre la amputación de la cola. En las lombrices muy jóvenes estimula la regeneración caudal de la mayoría de ellas (69,2%); pero cuando el animal avanza hacia la pubertad también en el cerebro aparece una nueva hormona o factor de reproducción (FRp), que inhibe en parte la acción del factor hormonal de regeneración (FRg). Por ello el número de lombrices preclitelares con regeneración caudal es menor (47,5%). El factor de reproducción creemos que podría ser el producto de neurosecreción elaborado por unas células semejantes a las "células a" de HUBL (1953-1956 a), "que no existen en los individuos jóvenes y se diferencian progresivamente en la proximidad de la madurez sexual".

Por último, y cuando las lombrices han desarrollado completamente el clitelo y están en plena madurez sexual, la neu-

rosecreción cerebral encaminada al proceso reproductivo es máxima y bloquea totalmente la acción estimuladora del factor de regeneración haciendo descender la capacidad de regeneración caudal de las lombrices adultas (30.5%) (Tabla IV). (El 30,5% de lombrices regeneradas podría deberse a cierta capacidad de respuesta de las células de la cadena ventral y/o del ganglio subfaringeo, como veremos más adelante).

Posteriormente realizamos nuevos experimentos con los que comprobamos la interacción de los factores regenerativo y reproductor.

Cogimos un lote de 48 lombrices adultas pero aún sin clitelo (preclitelares), en los meses de Mayo y primeros días de Junio, de peso y longitud similares, con las que hacemos cuatro lotes de 12 animales cada uno y los sometemos a las siguientes operaciones:

- 12 lombrices se dejan totalmente enteras (controles).
- A 12 animales extirpamos los ganglios cerebroides y amputamos de 40-50 segmentos caudales (experimentales).
- A otras 12 cortamos los 5-6 segmentos anteriores (ganglios supraesofágicos, ganglio subfaringeo y primeros ganglios de cadena nerviosa ventral). También amputamos de 40-50 segmentos caudales a este lote (experimentales).
- Por último, a otro lote de 12 animales les cortamos únicamente los 40-50 segmentos caudales dejándolos intactos cerebralmente (experimentales) (Tabla V).

A los 22 días después de la experimentación observamos que las lombrices con el cerebro "in situ" desarrollan un cli-

telo. Por el contrario, a las que de alguna forma se les han extirpado los ganglios cerebroides, siguen igual que al principio o sea, sin clitelo.

Al mismo tiempo, y en iguales condiciones hicimos otro experimento con un lote de 69 lombrices cliteladas. A 39 de ellas les amputamos los 6-7 primeros segmentos del cuerpo y los 40-50 segmentos caudales (experimentales). A las otras 30 lombrices sóloamente amputamos la región caudal, dejándolas intactas cerebralmente (controles) (Tabla V).

Después de 22 días, las 39 lombrices experimentales habían perdido su clitelo totalmente, mientras que los 30 animales controles continuaban con un clitelo bien desarrollado.

Nosotros, al igual que HERLANT-MEEWIS (1956) en E. foetida pensamos que en A. molleri la extirpación de los centros nerviosos cefálicos produce una regresión de los caracteres sexuales somáticos (clitelo, tubérculos pubertarios, etc.) y que los ganglios cerebroides son necesarios para la aparición y mantenimiento del clitelo.

En cuanto al papel del cerebro en la regeneración caudal, ya vimos anteriormente que mientras para HUBL (1956 b) en E. foetida y A. terrestris L. longe es estimulador del proceso regenerativo, para GALLISSIAN (1963), en Eophila dollfusi; MICHON, MAISSIAT y ANGEVAIN (1964), en Eiseniella tetraedra f. typica; JUBERTHIE y MESTROV (1965 b) en E. foetida; SAUSSEY (1966), en A. icterica; STEPHAN DUBOIS (1980) en Tubifex tubifex, etc. el cerebro ejerce una acción inhibidora de la regeneración caudal.

Nuestros experimentos en A. molleri nos inducen a considerar la hipótesis de que el cerebro es imprescindible para que las

-131 bis-

lombrices muy jóvenes puedan regenerar los últimos segmentos caudales, pero su poder estimulador va siendo bloqueado a medida que las lombrices avanzan hacia el estado adulto, por la aparición del factor de reproducción que inhibe de alguna manera la regeneración de la cola.

T A B L A V

Papel de los centros nerviosos anteriores sobre el desarrollo del clitelo en A. molleri preclitelares y clitelares sometidas a diferentes operaciones y amputadas de 40-50 segmentos caudales (experimentales). Comparación con lombrices enteras (controles) que no han sufrido amputación de los segmentos caudales. N<sup>o</sup>= Número de lombrices; %= Porcentaje de lombrices con clitelo; ( )= Lombrices que han regenerado la cola.

Estado	Tipo de operación	N <sup>o</sup>	22 días después experimento.
<b>Preclitelar</b>			
	Totalmente enteras (controles)	12	83% aparece clitelo (10)
	Descerebradas	12	Permanecen sin clitelo.
	Decapitadas	12	Permanecen sin clitelo.
	Intactas cerebralmente	12	75% aparece clitelo (9)
<b>Clitelar</b>			
	Intactas cerebralmente (controles)	30	Permanece clitelo (100%)
	Decapitadas (experimentales)	39	Desaparece clitelo

#### 4. Papel del ganglio subfaríngeo

Continuamos nuestros experimentos para tratar de averiguar en qué medida influye el ganglio subfaríngeo en la regeneración caudal de A. molleri. Para ello experimentamos con animales jóvenes inmaduros y con animales maduros sexualmente.

Con los primeros hacemos tres lotes que sometemos a tres temperaturas distintas; de frío entre 13º y 17º C; ambiental de 20º±2º C y con calor, en estufa a 26º C. Estas lombrices fueron recogidas en los meses de Noviembre, Febrero y Abril. Por último, hicimos otro grupo de 24 lombrices adultas, con clitelo, recogidas en Julio, de peso medio de 261 mg. A todas ellas desganglionamos y amputamos de 40-50 segmentos caudales (experimentales). Los resultados los exponemos en la Tabla VI, y los comparamos con los de otros lotes de lombrices recogidas en el mismo día a las que dejamos intactas cerebralmente, y a las que amputamos también 40-50 segmentos caudales (controles).

Vemos pues, que en A. molleri, cuando se le extirpa el ganglio subfaríngeo, sea cual sea su nivel de desarrollo y la temperatura a la que esté sometida, no existe prácticamente regeneración caudal o ésta es mínima, lo que nos lleva a pensar, que en A. molleri, como en otras especies de lumbricidos observados por HUBL (1956 a); AROS y VIGH (1961 b); MICHON (1962) y también MICHON, MAISSIAT y ANGEVAIN (1964), el ganglio subfaríngeo debe tener un papel estimulador en los procesos de regeneración caudal, y que, posiblemente, será en este ganglio donde esté localizado el principal centro endocrino o centro neurosecretor responsable de la regeneración de los últimos segmentos del cuerpo amputados ("células U" de HUBL).

Papel del ganglio subfaríngeo en la regeneración caudal de A. molleri. Comparación de porcentajes de regeneración caudal entre lombrices intactas (controles) y lombrices desganglionadas (experimentales), a diferentes temperaturas y después de seccionados 40-50 segmentos caudales. % - porcentaje de lombrices con regeneración caudal; ( ) = Lombrices que han regenerado. ~~Tabla~~

Grado de Desarrollo	Tipo de Operación	Temperatura	Número de lombrices	Peso medio lombriz (mg)	Regeneración caudal.
ADULTAS (sin clitelo)	Intactas	13°C-17°C	16	240	19% (3)
		20°C±2°C	23	130	48% (11)
		26°C	15	201	66% (10)
	Desganglionadas	13°C-17°C	13	218	15% (2)
		20°C±2°C	15	130	13% (2)
ADULTAS (con clitelo)	Intactas	26°C	20	201	25% (5)
		29°C-31°C	21	259	32'6% (7)
	Desganglionadas	29°C-31°C	24	261	11'3% (3)



#### 5.- Papel de los centros nerviosos anteriores y cadena nerviosa

Por último, al experimentar con lombrices a las que habíamos decapitado cortándoles los 5-6 primeros segmentos cefálicos, y amputando después los 40-50 segmentos caudales, observamos que estos animales, desprovistos de todos los centros nerviosos anteriores (ganglios supra e infraesofágicos y primeros ganglios de la cadena nerviosa ventral), también eran capaces de regenerar la cola, (aunque en bajo porcentaje), en condiciones normales de temperatura ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), humedad y oscuridad. (Tabla VII)

Hicimos varios experimentos: uno de ellos fue con animales muy jóvenes, 20 lombrices de 94 mg. de peso medio. Al extirparles los centros nerviosos anteriores comprobamos que eran incapaces de desarrollar un regenerado posterior (0%).

Otro grupo de lombrices, más o menos jóvenes, sin clitelo, lo sometimos, como en los experimentos anteriores, a tres temperaturas distintas; de frío ( $13^{\circ}$  a  $17^{\circ}\text{C}$ ); a un ambiente de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  y en estufa a  $26^{\circ}\text{C}$ .

También en estas lombrices decapitadas se deja notar la influencia de la temperatura con respecto a la regeneración caudal de las mismas, como se puede ver en la Tabla VII.

En las lombrices preclitelaes, próximas a la madurez sexual, podemos observar que existe un 33% de animales con regenerado posterior, igual que ocurre en las lombrices jóvenes sometidas a una temperatura ambiente normal ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ); mientras que en las lombrices en pleno período reproductivo, con un clitelo bien desarrollado, la capacidad regenerativa de los ani-

Papel de los centros nerviosos anteriores en la regeneración caudal de A. molleri. Comparación de porcentajes de regeneración caudal entre lombrices intactas (controles) y lombrices decapitadas (experimentales), a diferentes temperaturas y después de seccionados 40-50 segmentos caudales. % = Porcentaje de lombrices con regeneración caudal; ( ) = Lombrices que han regenerado la cola

Grado de Desarrollo	Tipo de Operación	Temperatura	Número de lombrices	Peso medio lombriz (mg)	Regeneración caudal
Muy Jóvenes	Intactas	20 $\pm$ 2 $\circ$ C	26	130	69'2% (18)
	Decapitadas	20 $\pm$ 2 $\circ$ C	20	94	0 % (0)
Jóvenes	Intactas	13 $\circ$ -17 $\circ$ C	6	180	0 % (0)
		20 $\pm$ 2 $\circ$ C	12	194	75% (9)
		26 $\circ$ C	15	201	66% (10)
	Decapitadas	13 $\circ$ -17 $\circ$ C	6	175	16% (1)
Preclitelares	Intactas	20 $\pm$ 2 $\circ$ C	12	213	33% (4)
		26 $\circ$ C	12	150	50% (6)
	Decapitadas	24 $\circ$ -26 $\circ$ C	28	225	47% (13)
Cliteladas	Decapitadas	24 $\circ$ -26 $\circ$ C	21	233	33% (7)
	Intactas	29 $\circ$ C-31 $\circ$ C	10	251	40% (4)
	Decapitadas	29 $\circ$ C-31 $\circ$ C	19	251	47% (9)

ebido aa las altas tempe-

ién pudimos observar có  
en un llote de 12 lombrí-  
dejamcos intactas cere-  
os seegmentos del cuer-  
putamos los 5-6 segmen  
s caudales (experimen-

os em ambas especies  
diferencias: la capaci  
itelada y decapitada  
la A. molleri (47%);  
lo e intacta parece te  
que la A. molleri intac  
ctivamente). Esto pue-  
ede ser encontrada con  
principalmente en pri  
eri solo se encuentra  
cuando las temperaturas  
duda la regeneración cau  
or otro lado ya anterior  
rente disposición de  
toras en el ganglio  
s. (Figs. 5, 6, 9 y 10).  
deducirse que estos Oli  
eración" para la que, co

mo JUBERTHIE y  
no necesitan  
Unicamente la c  
para que alguna  
cola.

Nosotros,  
MARCEL (1973 a)  
Oligoquetos con  
molleri para r  
producto de sec  
próximo al niv  
cer, son estimu  
terior del cuer  
del estímulo y  
particular.

En los e  
efecto de la ne  
regeneración ca  
las lombrices el

## 6.- Influencia

### 6.a.- Im rtanci

Desde un  
tante para tener

males se eleva a un 47%, creemos que debido a las altas temperaturas de la época.

En la especie A. caliginosa también pudimos observar cómo tenía lugar la regeneración caudal en un lote de 12 lombrices cliteladas. A 5 de estas lombrices dejamos intactas cerebralmente y sólo les amputamos los últimos segmentos del cuerpo (controles). A las 7 restantes les amputamos los 5-6 segmentos cefálicos e igualmente los segmentos caudales (experimentales). (Tabla VIII)

Comparando los resultados obtenidos en ambas especies de Allolobophora vemos que hay algunas diferencias: la capacidad regenerativa de la A. caliginosa clitelada y decapitada es bastante más grande (71%) que la de la A. molleri (47%); sin embargo, la A. caliginosa con clitelo e intacta parece tener menos poder de regeneración caudal que la A. molleri intacta y también clitelada (20% y 40% respectivamente). Esto puede ser debido a que la A. caliginosa puede ser encontrada con clitelo casi a lo largo de todo el año, principalmente en primavera y otoño, mientras que la A. molleri sólo se encuentra con madurez sexual en el mes de Julio, cuando las temperaturas son más elevadas, cosa que favorece sin duda la regeneración caudal, como comprobaremos más adelante. Por otro lado ya anteriormente pudimos observar que hay una diferente disposición de las células de la sexualidad neurosecretoras en el ganglio cerebroide de cada una de estas especies. (Figs. 5, 6, 9 y 10).

De todos estos resultados parece deducirse que estos Oligoquetos tienen una "capacidad de regeneración" para la que, como

mo JUBERTHIE y MESTROV (1965 b) habían observado en Eisenia no necesitan ni del cerebro, ni del ganglio subfaríngeo. Unicamente la cadena nerviosa ventral parece ser suficiente para que algunas lombrices sean capaces de regenerar una nueva cola.

Nosotros, al igual que MICHON (1962), CHAPRON (1970 a), MARCEL (1973 a) y STEPHAN DUBOIS (1980) en otras especies de Oligoquetos consideramos que la capacidad intrínseca de A. molleri para regenerar los segmentos caudales se debe "al producto de secreción de los ganglios de la cadena nerviosa, próximos al nivel de amputación", los cuales a nuestro parecer, son estimulados por los cortes de la parte anterior y posterior del cuerpo y depende, probablemente, de la intensidad del estímulo y de la capacidad de respuesta de cada animal en particular.

En los esquemas de las figuras 23 y 24 podemos ver el efecto de la neurosecreción de los centros nerviosos sobre la regeneración caudal en las lombrices muy jóvenes (Fig. 23) y en las lombrices cliteladas (Fig. 24).

## 6.- Influencia de factores ambientales en la regeneración caudal.

### 6.a.- Importancia de la temperatura.

Desde un principio un factor que nos pareció muy importante para tener en cuenta en relación con la regeneración cau-

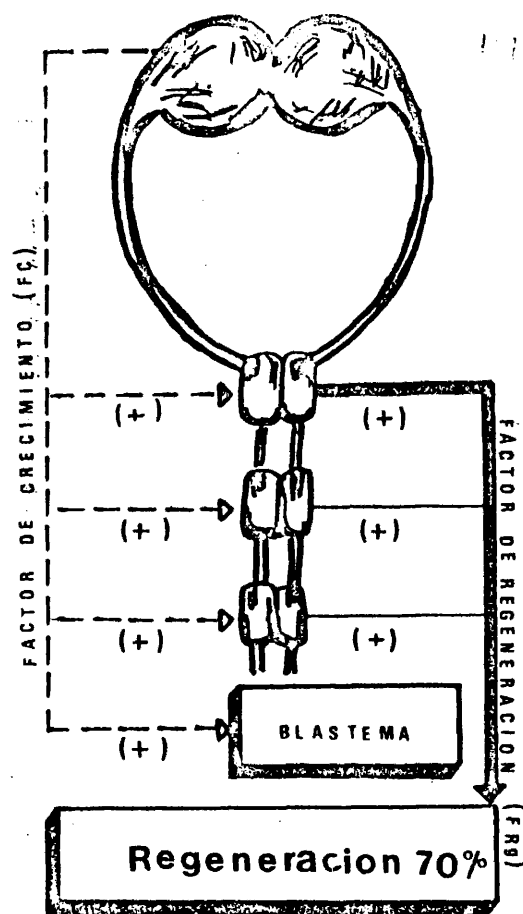
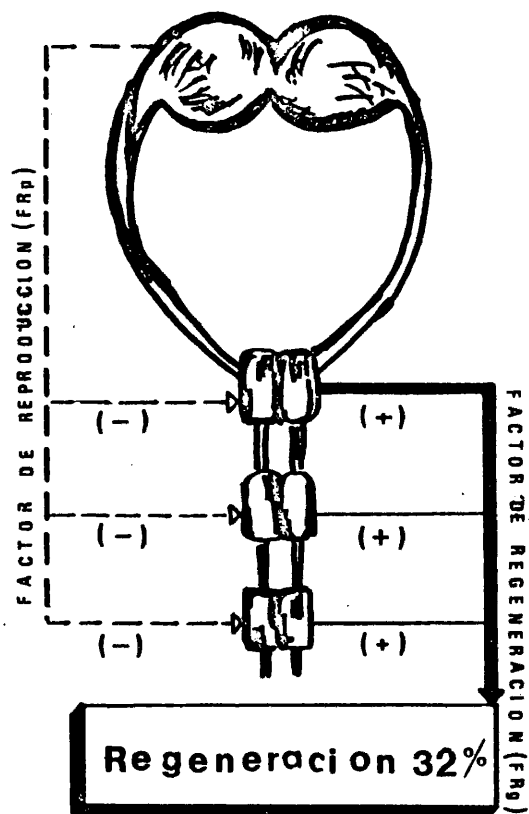


Figura 23.- Esquema del efecto de la neurosecreción de los centros nerviosos anteriores y cadena ventral sobre la regeneración caudal en *A. molleri* juveniles. El factor hormonal o factor de crecimiento (FC) existente en el ganglio cerebroide, actúa positivamente sobre el ganglio subfaríngeo, ganglios ventrales y, posiblemente, sobre el blastema de regeneración, liberando desde los centros nerviosos la hormona o factor de regeneración (FRg) dando lugar a que gran número de lombrices regeneren la cola (70%). El cerebro en las lombrices juveniles es activador de la regeneración caudal.



Esquema del efecto de la neurosecreción de los centros nerviosos anteriores y cadena ventral sobre la regeneración caudal en A. mulleri y A. caliginosa cliteladas. La neurohormona o factor de reproducción (FRp), que aparece en el cerebro en la pubertad inhibe la liberación desde el ganglio subfaríngeo de la neurohormona o factor de regeneración (FRg), disminuyendo la capacidad regenerativa de las lombrices (32%). El cerebro en las lombrices cliteladas es inhibidor de la regeneración caudal



T A B L A    VIII

Porcentajes de regeneración caudal en A. caliginosa cliteladas intactas cerebralmente (controles) y decapitadas (experimentales), amputadas de 40-50 segmentos caudales. Comparación con los porcentajes de regeneración en A. molleri cliteladas y sometidas a las mismas operaciones. % = Porcentaje de lombrices con regeneración caudal; ( ) = Lombrices que han regenerado cola.

Especie	Tipo de operación	Número de lombrices	23 días después experimentación
<u>A. caliginosa</u> cliteladas	Intactas	5	20% con regeneración (1)
	Decapitadas	7	71% con regeneración (5)
<u>A. molleri</u> Cliteladas	Intactas	10	40% con regeneración (4)
	Decapitadas	19	47% con regeneración (9)

dal en A. molleri fue la temperatura. Nuestro propósito era conocer qué influencia ejercía ésta en animales jóvenes y adultos, intactos cerebralmente, descerebrados, desganglionados y decapitados, a todos los cuales habíamos amputado de los 40-50 segmentos caudales. Como en todos nuestros experimentos anteriores, los colocamos aisladamente en placas petri, en iguales condiciones de humedad, oscuridad y ayuno.

Las lombrices con las que experimentamos primeramente fueron, unas juveniles, recogidas en los meses de Octubre y Noviembre; y otras, más o menos jóvenes, pero todavía sin clitelo, recogidas en los meses de Febrero, Marzo, Abril y Mayo. A todas las sometimos a tres temperaturas diferentes: una temperatura ambiente de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ; una temperatura baja de  $13\pm 2^{\circ}\text{C}$ ; y una temperatura elevada de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

En las Tablas IX, X, XI y XII podemos ver los resultados obtenidos.

Capacidad de regeneración caudal de lombrices jóvenes, sin clitelo, intactas cerebralmente en relación con la temperatura ambiente (Tabla IX).

Vemos aquí que, en las lombrices normales, o sea, que no han sufrido extirpación del cerebro, la regeneración caudal media de un lote de 82 animales es del 62%, a una temperatura ambiente de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ . El crecimiento de la cola es también normal.

El frío, temperatura de  $13\pm 2^{\circ}\text{C}$ , disminuye considerable-

T A B L A IX

Influencia de diferentes temperaturas en la regeneración caudal de A. molleri jóvenes intactas cerebralmente y amputadas de 40-50 segmentos caudales. %= Porcentaje de lombrices con regeneración caudal. ( )= Lombrices que han regenerado la cola.

Temperatura	Número de lombrices	Regeneración caudal	Epoca de recogida
13 $\pm$ 2 $\circ$ C	88	17% (15)	Febrero - Marzo Abril
20 $\pm$ 2 $\circ$ C	82	62% (51)	Octubre- Noviembre
26 $\pm$ 2 $\circ$ C	31	70% (22)	Mayo-Junio

mente la capacidad regenerativa de la lombriz (17%) y la velocidad de crecimiento de la cola se hace más lenta que en el lote anterior.

Por el contrario, un aumento de la temperatura,  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  provoca una mayor proporción de animales con regeneración caudal (70%), además de aumentar también la velocidad de crecimiento de la cola y la longitud del regenerado.

Capacidad de regeneración caudal de lombrices jóvenes sin clitelo, descerebradas, en relación con la temperatura ambiental (Tabla X).

En esta tabla podemos observar que el calor ( $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y el frío ( $13\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) en los animales a los que les ha sido extirpado el cerebro influye, como en las lombrices intactas cerebralmente, aumentando (74%) o disminuyendo (31%) respectivamente, la capacidad de regeneración caudal.

Igualmente la velocidad de crecimiento de la cola es muy lenta a baja temperatura y es muy rápida con temperatura elevada, siendo el número de segmentos regenerados también mayor.

Por otro lado, podemos ver que de un lote de 51 lombrices descerebradas pero sometidas a una temperatura ambiente de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ . sólo regeneran el 23%, como también pudimos observar en la Tabla IV, en el apartado de lombrices jóvenes descerebradas de las que únicamente regeneran el 25% a la temperatura de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Este resultado, que a primera vista puede parecer un poco anómalo, creemos puede ser debido a dos causas: la edad de las lombrices y el calor. En efecto, la mayoría de los animales que forman este lote son lombrices muy jóvenes y por ello, como ya demostramos anteriormente, necesitan del cerebro para poder regenerar la cola. Por otra parte, la temperatura, que según nuestra opinión, juega un importantísimo papel en los procesos de regeneración caudal, es poco elevada ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y no es suficiente para estimular el ganglio subfaríngeo. Ya expusimos con anterioridad que, a nuestro parecer, el ganglio

subfaríngeo podría ser el centro neurosecretor principalmente responsable de la regeneración caudal en A.molleri. Pues bien, nosotros creemos que para que se libere el "factor de regeneración", este ganglio subfaríngeo tiene que ser estimulado. En las lombrices muy jóvenes el estímulo procedería del "factor hormonal" o "factor de crecimiento" liberado desde el cerebro; por eso éste sería imprescindible para que las lombrices juveniles regenerasen (la época de abundancia de lombrices juveniles es el otoño principalmente, cuando las temperaturas son poco elevadas).

En los animales jóvenes descerebrados "el calor sería el factor estimulador del ganglio subfaríngeo". Así podría explicarse el hecho de que las lombrices jóvenes descerebradas de nuestros experimentos, a una temperatura de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  no regeneran más que el 23% y el 25% del total, mientras que en el otro grupo de lombrices también jóvenes e igualmente descerebradas pero sometidas a una temperatura alrededor de los  $26^{\circ}\text{C}$  la regeneración caudal se eleva al 77% y 74% (Tabla IV y Tabla X). Por tanto, creemos que en las lombrices descerebradas solamente el calor es capaz de inducir la regeneración caudal de la mayoría de los animales (77% y 80%, Tabla IV y 74%, Tabla X), siendo la velocidad de crecimiento del regenerado muy grande.

A nuestro parecer, solamente cuando la temperatura alcanza un determinado nivel, seguramente por encima de los  $25^{\circ}\text{C}$  actúa sobre el ganglio subfaríngeo haciendo que éste libere el factor de regeneración necesario para que las lombrices regeneren una nueva cola.

T A B L A     X

Influencia de la temperatura en la regeneración caudal de A. molleri jóvenes descerebradas y amputadas de 40-50 segmentos caudales. % = Porcentaje de lombrices con regeneración caudal. ( ) = Lombrices que han regenerado la cola.

Temperatura	Número de lombrices	Regeneración caudal	Epoca de recogida
13 $\pm$ 2 $\circ$ C	34	31% (11)	Febrero-Marzo
20 $\pm$ 2 $\circ$ C	51	23% (12)	Octubre-Noviem.
26 $\pm$ 2 $\circ$ C	41	74% (35)	Mayo-Junio

Otro punto que nos llama la atención es el hecho de que 34 lombrices jóvenes descerebradas colocadas a una temperatura baja de  $13\pm 2^{\circ}\text{C}$  regeneran en mayor proporción (31%) que el lote de 51 lombrices sometidas a temperatura ambiente de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  (23%). (Tabla X) La justificación de esto hemos pensado que puede ser debida al hecho de que en este grupo los animales, aunque todos jóvenes, podrían estar en diferente estado de desarrollo; las lombrices que estuvieran más cerca de la pubertad tendrían también, al estar descerebradas, más capacidad de regeneración, como demostramos anteriormente (véase influencia del grado de desarrollo).

Capacidad de regeneración caudal de lombrices jóvenes sin clitelos desganglionadas, en relación con la temperatura ambiental.  
(Tabla XI).

Como ya apuntamos anteriormente, la temperatura es un factor que, a nuestro modo de entender, influye de una forma muy especial sobre los ganglios infraesofágicos. Como hemos comprobado experimentalmente, si extirpamos éstos, las lombrices desganglionadas regeneran en una ínfima proporción, tanto si están sometidas a una temperatura normal de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , de las que sólo regeneran el 13%, como si la temperatura es elevada,  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , con una regeneración del 25%, o si la temperatura es baja,  $13\pm 2^{\circ}\text{C}$ , de las que llegan a formar una nueva cola sólo el 15%.

T A B L A   X I

Influencia de distintas temperaturas en la regeneración caudal de A. molleri jóvenes desganglionadas después de amputados 40-50 segmentos caudales. % = Porcentaje de lombrices con regeneración caudal. ( ) = Lombrices que han regenerado la cola.

Temperatura	Número de lombrices	Regeneración caudal	Epoca de recogida
13º±2ºC	13	15% (2)	Febrero
20º ± 2ºC	15	13% (2)	Noviembre
26º±2ºC	20	25% (5)	Mayo



Sin embargo, si el ganglio subfaríngeo permanece "in situ" hemos comprobado anteriormente que en los individuos intactos y descerebrados, la regeneración, en las lombrices jóvenes, alcanza gran proporción (66% y 77%) respectivamente, siempre que el calor sobrepase los  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Tablas III y IV). Estos resultados vienen a comprobar nuestra suposición de que el calor ejerce una acción estimuladora sobre el ganglio subesofágico en las lombrices descerebradas, semejante a la acción del "factor hormonal" liberado desde el cerebro en las lombrices intactas.

Capacidad de regeneración caudal de lombrices jóvenes sin clitelo decapitadas, en relación con la temperatura ambiental.  
(Tabla XII).

Como vemos en esta tabla, las lombrices amputadas de todos los centros nerviosos anteriores son capaces de regenerar una nueva cola. Esta capacidad intrínseca de regeneración de A. molleri, más o menos jóvenes, es de un 33% aproximadamente, y podemos observar también que este poder de regeneración puede ser aumentado y disminuido por factores externos como la temperatura. En efecto, una temperatura elevada de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  provoca un aumento hasta un 41% de lombrices con un regenerado posterior, mientras que un descenso de temperatura,  $13\pm 2^{\circ}\text{C}$ , determina igualmente una disminución del tanto por ciento de lombrices con regeneración caudal (16%) e incluso la incapacidad para regenerar, si la temperatura es inferior a  $10^{\circ}\text{C}$ . Resulta

T A B L A    XII

Influencia de difentes temperaturas en la regeneración caudal de A. molleri jóvenes decapitadas y amputadas de 40-50 segmentos caudales. % = Porcentaje de lombrices con regeneración caudal. ( ) = Lombrices que han regenerado la cola.

Temperatura	Número de lombrices	Regeneración caudal	Epoca de recogida
10º C	20	0 %	Febrero
13º±2ºC	26	16% (4)	Febrero-Abril
20º±2ºC	12	33% (4)	Noviembre
26º±2ºC	24	41% (10)	Mayo-Junio

tados análogos pudimos observar en la Tabla VII, en el apartado de lombrices jóvenes decapitadas y sometidas a diferentes temperaturas.

De la comparación de las Tablas IX, X, XI XII deducimos que, si consideramos como temperatura ambiente normal los  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , todas las lombrices, cualquiera que haya sido el tipo de operación a que fueron sometidas, responden, en general, con una disminución de su capacidad de regeneración caudal, si la temperatura es inferior a  $13\pm 2^{\circ}\text{C}$ ; o bien, con una estimulación de la misma, si la temperatura es superior a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Igualmente vemos que la velocidad de crecimiento de la cola responde de la misma manera, es decir, se hace más lenta cuando la temperatura ambiente disminuye y se acelera en gran proporción cuando la temperatura es más elevada.

Ya SAUSSEY (1961) comprobó en A. ictérica que en invierno o en baja temperatura la regeneración no tiene lugar, y en el verano o a una temperatura próxima a los  $20^{\circ}\text{C}$  los animales regeneraban.

Podemos pues decir, que en general el calor favorece la regeneración caudal y aumenta la velocidad de crecimiento del regenerado. El frío, por el contrario, inhibe o al menos retarda considerablemente la aparición del regenerado caudal, quizás porque disminuye la actividad mitótica de las células del blastema de regeneración y hace que el crecimiento de la cola sea más lento e, incluso, que éstas sean más cortas.

También al comparar los resultados nos llama la atención el hecho de que las lombrices jóvenes que han sufrido la extirpación de los centros nerviosos anteriores son capaces de rege-

nerar una nueva cola en mayor proporción que las lombrices desganglionadas y descerebradas jóvenes que sólo han perdido el ganglio subfaríngeo o el ganglio supraesofágico respectivamente.

A nuestro entender, es el stress consecutivo a la amputación lo que determina el aumento del número de lombrices con regeneración caudal, es decir, la lombriz al serle amputada la cabeza y la cola sufre, como es natural, un trauma mayor que si se le extirpa únicamente el ganglio subfaríngeo o el ganglio cerebroide, lo que produce un más fuerte estímulo local de las células neurosecretoras de la cadena nerviosa próximas al nivel de amputación.

En las lombrices cliteladas, que aparecen ya en época del año con temperaturas elevadas,  $29\pm 2^{\circ}\text{C}$ , las células responsables de la sexualidad ("células a") de HERLANT-MEEWIS (1956); HUBL (1953, 1956 a) y MICHON y ALAPHILIPPE (1959) etc. han hecho su aparición en el cerebro y su neurosecreción (FRp) inhibidora del ganglio subesofágico, bloquea la acción estimuladora del calor.

Es decir, la hormona o factor de reproducción, existente en el cerebro, influye negativamente sobre el ganglio subfaríngeo e impide la liberación del factor de regeneración, bloqueando la acción estimuladora que el calor pueda ejercer sobre el mismo. Por esto, las lombrices intactas cliteladas regeneran en una pequeñísima proporción la cola amputada a pesar del calor de la época que, como comprobamos anteriormente, es un agente estimulador de la regeneración caudal (Tabla XIII).

T A B L A XIII

A. molleri y A. caliginosa cliteladas. Porcentajes de regeneración caudal de ambas especies sometidas a diferentes operaciones y amputadas de 40-50 segmentos caudales. % = Porcentaje de lombrices con regeneración caudal. ( ) = Lombrices que han regenerado la cola.

Especie	Tipo de operación	Tempra.	Número lombrices	Regen. caudal	Epoca recop.
<u>A. moller</u> i cliteladas	Intactas	29 $\pm$ 2 $\pm$ C	31	34'5% (11)	Julio
	Descerebradas	29 $\pm$ 2 $\pm$ C	15	80% (12)	Julio
	Desganglionadas	29 $\pm$ 2 $\pm$ C	24	11% (3)	Julio
	Decapitadas	29 $\pm$ 2 $\pm$ C	19	47% (9)	Julio
<u>A. caliginosa</u> cliteladas	Intactas	27 $\pm$ 2 $\pm$ C	6	16'6% (1)	Abril
	Decapitadas	27 $\pm$ 2 $\pm$ C	7	71% (5)	Abril

6.b.- Importancia del grado de humedad.

Una vez observada la temperatura quisimos averiguar qué otros factores influían en la capacidad regeneradora de la especie Allolobophora molleri. Comenzamos con el factor humedad-sequedad.

Para ello sometimos un lote de 12 lombrices a un ambiente de "humedad" y otro lote también de 12 lombrices a un ambiente de "sequedad". Las primeras las colocamos aisladamente en placas petri con 4 ml. de agua desclorada. Las segundas fueron también colocadas aisladamente en las petri, pero sólo con un papel de filtro humedecido en agua desclorada.

Las 24 lombrices jóvenes, sin clitelo, fueron recogidas en los meses de Octubre-Noviembre en condiciones óptimas. Su peso medio era de 133 mg. A todas ellas les amputamos de 40-50 segmentos caudales. Son mantenidas en oscuridad, ayuno y a una temperatura ambiente de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ . (Tabla XIV).

Vemos que las lombrices colocadas en "humedad" comenzaban a regenerar más precozmente que las colocadas en ambiente de "sequedad", y que al cabo de un número determinado de días, la cantidad de lombrices con regeneración caudal era algo mayor en las colocadas en "humedad".

También comprobamos en A. molleri, como JUBERTHIE y MESTROV (1965 a) en Eophila pyrenaica, que la humedad favorecía la velocidad de crecimiento del regenerado. Es por ello, por lo que todos nuestros experimentos los hemos realizado en ambiente húmedo.

Posteriormente, repetimos el experimento con un conjun

to de 40 lombrices de 151 mg. de peso medio recogidas en el mes de Febrero y a las que dividimos en dos grupos: un lote de 20 lombrices las colocamos en ambiente de humedad (controles). Otros 20 animales los dejamos en ambiente de sequedad (experimentales). Como los anteriores fueron mantenidas en oscuridad, ayuno y a la misma temperatura de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ . (Tabla XIV).

También pudimos comprobar que las lombrices en humedad comenzaban a regenerar antes que las colocadas en sequedad y que la proporción de animales con regeneración era también algo mayor en las lombrices mantenidas en ambiente húmedo. Además observamos diferencias en las colas regeneradas. Las de las lombrices colocadas en humedad son finas y muy irrigadas, llegando a alcanzar más longitud que las colas de los animales colocados en sequedad, que son más gruesas.

Vemos pues, que en la especie A. molleri, contrariamente a lo que SAUSSEY (1961) observa en A. icterica, un ambiente más húmedo favorece mayormente la regeneración de los segmentos caudales, lo cual podría estar relacionado con el hecho de que A. icterica, según este autor, solamente regenera en período de diapausa, que puede ser producida por una sequía intensa.

#### 6.c. Influencia de la luz.

Otro factor externo que consideramos necesario investigar fue la luz. Se sabe que la lombriz Allolobophora molleri es bastante lucífuga, pues su habitat natural está a bastante profundidad de la superficie del terreno. Quisimos comprobar experi-

T A B L A      XIV

Comparación de porcentajes de regeneración caudal en A. mollerí sometidas a un ambiente de "humedad" y de "sequedad" después de amputados 40-50 segmentos caudales. % = Porcentaje de lombrices con regeneración caudal. ( ) = Lombrices que han regenerado la cola.

AMBIENTE	Epoca de recogida	Tempera- tura.	Número lombric.	Días después del experimento			
				9	14	21	28
HUMEDAD (+ oscuridad)	Oct.-Nov.	20 $\pm$ 2 $\pm$ 2 $\pm$ C	11	27%	63%	72%	72%
				(3)	(7)	(8)	(8)
	Febrero	20 $\pm$ 2 $\pm$ 2 $\pm$ C	20	10%	20%	35%	45%
				(2)	(4)	(7)	(9)
SEQUEDAD (+ oscuridad)	Oct.-Nov.	20 $\pm$ 2 $\pm$ 2 $\pm$ C	12	0%	33%	50%	66%
				(0)	(4)	(6)	(8)
	Febrero	20 $\pm$ 2 $\pm$ 2 $\pm$ C	17	0%	6%	24%	41%
				(0)	(1)	(4)	(7)



mentalmente qué influencia podría ejercer la luz sobre la capacidad de dicha lombriz para regenerar la cola amputada. Para ello sometimos un conjunto de animales a dos ambientes diferentes, uno de luz y otro de oscuridad.

El material con el que experimentamos fueron 36 lombrices jóvenes, sin clitelo, de 165 mg. de peso medio recogidas en el mes de febrero. Hicimos con éstas dos lotes: uno de 18 lombrices que mantuvimos en luz; otro lote de 18 animales a los que colocamos en oscuridad. A todos ellos los dejamos en ayuno, humedad y a temperatura ambiente de 13º a 17ºC (hacemos la observación de la temperatura porque sin duda influyó en la escasa proporción de animales que regeneraron la cola) (Tabla XV).

Como podemos observar, la proporción de lombrices con regeneración caudal es de 3 a 1 a favor de las mantenidas en oscuridad. También pudimos comprobar que la velocidad de crecimiento de la cola es mayor en las lombrices mantenidas en ambiente oscuro.

Posteriormente, realizamos un nuevo experimento con 40 lombrices, a las que dejamos intactas cerebralmente y, como siempre, amputadas 40-50 segmentos caudales. 20 lombrices las colocamos en oscuridad y otras 20 las dejamos en luz. Todas ellas en humedad y a temperatura de laboratorio (20±2ºC) (Tabla XV).

Podemos observar pues, que las lombrices "en luz" son más tardías para regenerar que las dejadas en ambiente de oscuridad así como también la velocidad de crecimiento de la cola es menor y la longitud final del regenerado, en igualdad de

T A B L A XV

Comparación de porcentajes de regeneración caudal en A. molleri sometidos a un ambiente de "oscuridad" y de "luz", después de seccionados 40-50 segmentos caudales. % = Porcentaje de lombrices con regeneración caudal. ( ) = Lombrices que han regenerado la cola.

AMBIENTE	Epoca recogida	Temperatura	Número	Días después del experimento			
				18	25	27	35
OSCURIDAD (+ Humedad)	Febrero	13º-17ºC	18	11%	11%	33%	33%
				(2)	(2)	(6)	(6)
	Febrero	20º±2ºC	20	10%	30%	35%	45%
				(2)	(6)	(7)	(9)
LUZ (+ Humedad)	Febrero	13º-17ºC	18	0 %	0 %	11%	11%
				(0)	(0)	(2)	(2)
	Febrero	20º±2ºC	20	5%	15%	30%	40%
				(1)	(3)	(6)	(8)

tiempo, es también algo más pequeño. La capacidad de regeneración de las lombrices colocados en luz es también menor que la de aquellas lombrices colocados en ambiente oscuro (40% y 45% respectivamente).

Vemos pues, que la luz ejerce un efecto retardador sobre la regeneración caudal.

Por último, quisimos hacer otro experimento conjuntando los dos factores que, según nuestras experiencias, resultaban más desfavorables para la vida de A. molleri. Estos dos factores fueron "luz" y "sequedad".

Para ello, colocamos un lote de 20 lombrices, de peso medio de 126 mg, recogidas en el mes de Febrero, en luz y con sólo un papel de filtro humedecido en agua desclorada. Comparamos estos resultados con otras lombrices controles mantenidas en humedad y oscuridad y a una temperatura de 20º 2ºC, como los anteriores (Tabla XVI).

Después de 30 días, vimos que sólo habían regenerado la cola un 15% de lombrices sometidas a los dos factores negativos, mientras que como se puede comprobar en la Tabla XVI las lombrices en oscuridad y humedad regeneraban un 45% (la escasa proporción de lombrices con regenerado caudal colocadas en ambiente favorable puede ser debida a que muchas de ellas ya estarían entrando en la pubertad y la capacidad regenerativa va siendo menor, como explicamos anteriormente). El tipo de cola regenerada es también distinto. Como ya dijimos anteriormente, las colas regeneradas de las lombrices colocadas en oscuridad y humedad son largas, finas y muy irrigadas, mientras que las de los animales colocados en luz y sequedad,

T A B L A XVI

Porcentajes de regeneración caudal en A. molleri sometidas en un ambiente de "luz" y de "sequedad" (factores negativos), después de amputados 40-50 segmentos caudales. Comparación con lombrices controles sometidas a un ambiente de "oscuridad" y de "humedad" (factores positivos), también amputadas de 40-50 segmentos caudales. % = Porcentaje de lombrices con regeneración caudal. ( ) = Lombrices que han regenerado la cola

AMBIENTE	Epoca de recogida	Temperatura	Número	Días después del experimento.			
				13	17	24	30
LUZ: + SEQUEDAD	Febrero	20 <sup>o</sup> ± 2 <sup>o</sup> C	20	10%	15%	15%	15%
(Experimentales)				(2)	(3)	(3)	(3)
OSCURIDAD + HUMEDAD	Febrero	20 <sup>o</sup> ± 2 <sup>o</sup> C	20	10%	20%	35%	45%
(Controles)				(2)	(4)	(7)	(9)

son anchas, mazudas y de una conformación como el resto del cuerpo del animal.

Llegamos pues a la conclusión, a la vista de los resultados obtenidos con los diferentes factores externos con los que hemos experimentado, de que el medio de vida en el laboratorio más idóneo para la especie A. mollerí, en relación con la regeneración caudal, era la humedad, oscuridad y una temperatura ambiente aproximada de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

162

RESUMEN

---

El principal objeto de nuestro trabajo era comprobar experimentalmente qué función tenían todos y cada uno de los centros nerviosos anteriores en la regeneración caudal de Allolobophora molleri y A. caliginosa. Pero a medida que avanzábamos en nuestros trabajos nos pudimos dar cuenta de que considerar la acción de estos centros nerviosos aisladamente había conducido sin duda, a conclusiones erróneas.

Como hemos podido comprobar en una extensa bibliografía existe una gran contradicción en las opiniones de los diferentes autores acerca del papel activador o inhibidor de los centros nerviosos anteriores sobre la regeneración caudal en los Anélidos.

Nuestras experiencias nos han llevado a considerar que las lombrices, jóvenes y adultas, al menos las especies estudiadas por nosotros, tienen una "capacidad intrínseca" para regenerar los segmentos caudales amputados debido, probablemente, a la neurosecreción de las células de la cadena nerviosa ventral próximas al nivel de amputación. Esta capacidad regenerativa puede ser aumentada o disminuida por la acción de factores externos tales como el fotoperíodo cambiante que depende de la época del año, la temperatura, época de lluvias (humedad), etc..

Sin embargo, hemos comprobado que la capacidad de regeneración caudal depende, fundamentalmente, del grado de desarrollo en que el animal se encuentre cuando tiene lugar la amputación de la cola.

Las lombrices muy jóvenes necesitan del cerebro para regenerar los segmentos caudales. Esto nos hace suponer que en

el cerebro debe existir un "factor hormonal" o "factor de crecimiento" imprescindible para que las lombrices puedan volver a formar unos nuevos segmentos. En estos animales juveniles el cerebro tiene pues, un papel estimulador de la regeneración caudal. Las lombrices adultas y cliteladas, por el contrario, no solamente no requieren los ganglios supraesofágicos, sino que más bien su extirpación posibilita a estos animales para regenerar los segmentos caudales amputados.

Aunque GOLDING (1967) en Nereis considera que tanto la regeneración caudal como la maduración de las gónadas y, por consiguiente la reproducción sexual son debidas a diferentes actividad fisiológica de una única hormona liberada desde el ganglio supraesofágico, nosotros creemos que la hormona o factor de la regeneración es independiente de la hormona o factor de la regeneración es independiente de la hormona o factor de la reproducción y que ambas están localizadas en distinto lugar. A nuestro parecer, la hormona o factor de regeneración caudal, en A. molle-  
ri tiene su asiento principalmente en el ganglio subfaríngeo; por ello las lombrices desganglionadas pierden, en su mayoría, la capacidad de regenerar la cola. El ganglio subfaríngeo es activador, por tanto, de la regeneración caudal, como ya HUBL (1956 a, b) había observado en A. terrestris f. longa.

Sin embargo, de acuerdo con GOLDING suponemos que es en el ganglio cerebroide desde donde, seguramente, se libera la hormona u hormonas de la reproducción que intervienen no solamente en ésta, sino también en el desarrollo de los caracteres sexuales externos (BERJON, 1968) y en la puesta de los capullos



(ANDRE y cols., 1971), y cuya actividad parece bloquear la liberación del factor de regeneración caudal desde el ganglio subfaríngeo; es decir la regeneración es máxima en las lombrices cuando todavía no existe en el cerebro neurosecreción sexual, como hemos comprobado.

Podemos suponer, por tanto, que, el cerebro, en la época de la reproducción, regula la regeneración caudal de las *Allolobophora* adultas, mediante la neurosecreción de las células cerebrales que estimulan la función reproductora, impidiendo la liberación del factor a hormona de regeneración desde el ganglio subfaríngeo -que es donde ésta tiene su origen- y desde la cadena ventral. Por ello las lombrices cliteladas tienen un escaso poder para regenerar los últimos segmentos amputados.

En estas lombrices adultas el cerebro juega pues un papel "inhibidor" de la regeneración caudal.

Ya MICHON, MAISSIAT y ANGEVAIN (1964), en sus trabajos sobre *Eiseniella tetraedra f. typica* consideraban que la regeneración caudal estaba sometida a dos efectos antagonistas, uno "inhibidor" producido por las "células b" del cerebro y otro "activador" procedente de las "células U" del ganglio subfaríngeo.

Nosotros en *A. molleri* atribuímos a estas neurosecreciones un papel distinto: consideramos que existe solamente ese antagonismo en las lombrices cliteladas, es decir el cerebro actúa únicamente como inhibidor de la regeneración caudal en las lombrices maduras sexualmente, como ya expusimos antes, debi

do a la neurosecreción de las "células a" que, según HUBL (1953-1956 a); HERLANT-MEEWIS (1955-1956); SAUSSEY (1966); GALLISSIAN y GIRARDIE (1972), etc. se activan en la época de la reproducción. Por el contrario la neurosecreción de las "células b" presentes en todos los animales desde el nacimiento, sería, a nuestro parecer, el "factor hormonal" o "factor de crecimiento" que estimularía a las "células U" del ganglio subfaríngeo para la liberación del "factor de regeneración" en las lombrices juveniles, las cuales, como también hemos comprobado anteriormente son incapaces de regenerar la cola amputada cuando les falta el cerebro.

Por otra parte hemos comprobado que los animales jóvenes descerebrados no tienen tampoco un poder de regeneración muy grande, a no ser que la temperatura sobrepase un determinado nivel. Esto nos hace considerar que el "calor" es otro estímulo capaz de actuar sobre el ganglio subfaríngeo y ganglios nerviosos ventrales y liberar el "factor de regeneración caudal". Por eso las lombrices jóvenes, sólo cuando están sometidas a una temperatura superior a 25°C tienen capacidad regenerativa hasta de 74% - 77%, mientras que si la temperatura es de 20±2°C sólo regeneran el 23% o 25% del total de lombrices amputadas caudalmente.

En las lombrices adultas decapitadas no existe cerebro que inhiba la regeneración caudal, pero tampoco existe ganglio subfaríngeo estimulador de la misma. Por eso el número de lombrices que regeneran por la propia capacidad intrínseca es aproximadamente el 33% del total de lombrices jóvenes, cantidad que aumenta hasta aproximadamente el 47% en las lombri-

ces cliteladas debido, probablemente, a la elevada temperatura de la época.

Por último hemos observado que en condiciones experimentales, los factores externos más positivos para la regeneración caudal de A. molleri son la humedad, la oscuridad y una temperatura ambiente de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

De todo lo expuesto, podemos sacar las siguientes conclusiones:

168

## CONCLUSIONES

---

19) En Allolobophora molleri (Rosa) y Allolobophora caliginosa (Sav.), el sistema neuroendocrino juega un importante papel en la regeneración caudal, siendo las neurohormonas mediadoras en el control de la misma.

29) La regeneración caudal depende fundamentalmente del grado de desarrollo del animal, es decir, la capacidad regenerativa de la lombriz es distinta según que ésta se encuentre en estado juvenil, preclitelar o clitelar.

En condiciones naturales, la capacidad regenerativa de la Allolobophora es máxima en los animales muy jóvenes, descendiendo dicha capacidad cuando el animal se acerca a la madurez sexual.

39) Los ganglios supra e infraesofágica son reguladores de la regeneración caudal:

El cerebro, en las lombrices muy jóvenes es imprescindible para poder regenerar los segmentos caudales amputados, ya que parece existir en él un factor humoral o factor de crecimiento (F.C.) capaz de estimular al ganglio subfaringeo y ganglios de la cadena nerviosa ventral, dando lugar a la liberación desde éstos de la hormona o factor de regeneración (F.Rg.). El cerebro actúa pues en las lombrices juveniles, como "activador" de la regeneración caudal.

49) En el cerebro de las lombrices próximas a la pubertad, parece ser que se activan unas células -células de la sexualidad- cuya neurosecreción bloquearía la acción estimuladora

ra del ganglio subfaríngeo principalmente, y de los ganglios de la cadena ventral, impidiendo así el desarrollo de un regenerado caudal. Así pues, es en el cerebro donde suponemos está el origen de la neurohormona o factor de reproducción (F Rp).

En las lombrices adultas cliteladas, la presencia del cerebro impide la regeneración de los segmentos posteriores extirpados, por lo que se puede decir que en las lombrices maduras sexualmente, el cerebro es "inhibidor" de la regeneración caudal.

59) Los ganglios cerebroides son necesarios para la aparición y mantenimiento del clitelo y de los caracteres sexuales secundarios.

60) El ganglio subfaríngeo creemos es el principal centro neuroendocrino responsable de la regeneración caudal. La desganglioneización de las lombrices, cualquiera que sea su nivel de desarrollo, es correlativa con una disminución de la capacidad para regenerar los segmentos caudales amputados. La liberación del factor de regeneración sólo se produce cuando ese ganglio infraesofágico es estimulado. El principal estímulo sería, en las lombrices muy jóvenes, el factor hormonal o factor de crecimiento procedente del cerebro, el cual requiere de una temperatura adecuada, creemos que es de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , para que las células neurosecretoras funcionen activando con su neurosecreción (F.C.), el ganglio subfaríngeo, los ganglios de la cadena nerviosa y también,

probablemente, las células del blastema de regeneración caudal.

En las lombrices adultas, pero aún sin clitelo, el estímulo sería el "calor", siempre que la temperatura sobrepasara un determinado nivel (25°C aproximadamente).

El ganglio subfaríngeo es pues "estimulador" de la regeneración caudal.

7o) En las A. molleri adultas preclitelares y clitelares decapitadas existe una "capacidad" para regenerar los segmentos caudales amputados. Este poder de regeneración creemos podría deberse a las células neurosecretoras de la cadena nerviosa ventral próximas al nivel de amputación, activadas por factores diversos: unos internos, como el estímulo provocado por la herida; otros ambientales, como el fotoperíodo cambiante, la humedad y la temperatura.

8o) El factor calor-frío afecta a la capacidad regenerativa de la lombriz activando o disminuyendo ésta, respectivamente. Las temperaturas extremas inhiben o retrasan considerablemente la regeneración caudal.

El calor aumenta la velocidad de crecimiento de la cola y adelanta la aparición del regenerado.

La humedad, la oscuridad y una temperatura ambiente de  $22\pm 2^\circ\text{C}$  son las condiciones idóneas para la regeneración caudal de A. molleri en el laboratorio.

112

BIBLIOGRAFIA

---



ALVAREZ, J. (1971). Los Oligoquetos terrícolas de la Peninsula Ibérica. Tesis Doctoral. Univ. Complutense. Madrid.

ANDRE, F., BARLE, L. and RIVIERE, S. (1971). Mécanisme neuro-endocrines du depot de cocons chez Eisenia foetida. Bulletin de la Société Zoologique de France, 96, 399-403.

AROS, B. (1974). Synapses in the neurosecretory system of the earthworm. 296 In: Neurosecretion. The final neuroendocrine pathway. Ed: F. KNOWLES and L. VOLLRATH. London, Berlin/Heidelberg/ New York. Springer Verlag.

AROS, T.W., RÖHLICH, P., VIGH, B., VIGH-TEICHMANN, I. (1980). Immunocytochemical studies on the central Nervous System of the earthworm, Lumbricus terrestris. Acta Biol. Acad. Sci. Hung., 31 (1-3), 13-23.

AROS, B., VIGH, B. (1961 a). Neurosecretory changes in the nervous system of Lumbricus rubellus Hoffn. Provoked by various experimental influences. Acta Biol. Hung. 12, 87-98.

AROS, B., VIGH, B. (1961 b). Neurosecretory activity of the central and peripheral nervous system in the earthworm. Acta Biol. Academiae Scientiarum hungaricae, 12, 169-189.

AROS, B., VIGH, B., TEICHMANN, I. (1965). The structure of the neurosecretory system of the earthworm. Symp. Biol. Hung. 5, 303-316.

AROS, B., VIGH, B., TEICHMANN, I. (1975). The synaptic connections of the subpharyngeal ganglion in the earthworm (Lumbricus terrestris). Biologia, 23, 7-11.

AROS, B., VIGH, B., VIGH-TEICHMANN, I. (1977). Intra-and extra-ganglionic nerve endings formed by neurosecretory cells of the cerebral ganglion of the earthworm (Lumbricus terrestris L.) Cell Tiss. Res. 180, 537-553.

AROS, B., WENGER, t., VIGH, B., VIGH-TEICHMANN, I. (1980). Immunohistochemical localization of substance P and ACTH-like activity in the central nervous system of the earthworm Lumbricus terrestris L. Acta histochem., 66, 262-268.

AVEL, M. (1928). Sur la diapause printanière et estivale de quelques Lombriciens. Bull. soc. Zool. France, 53, 324-328.

AVEL, M. (1929). Recherches expérimentales sur les caracteres sexuels somatiques des Lumbriciens. Bulletin biologique de la France et de la Belgique, Paris, 63, 149-318.

AVEL, M. (1947). Les facteurs de la régénération chez les Annélides. Rev. Suisse Zool., 54, 219-235.

AVEL, M. (1959). Classe de Annélides Oligochetes. In Traité de Zoologie (ed. GRASSE) 5, 224-470. Paris: Masson.

AVEL, M. (1961). L'influence du système nerveux sur la régénération chez les Urodèles et les Oligochètes. Bull. Soc. Zool. France, 86, 464-483.

BALISNKY, B.I. (1965). An Introduction to Embriology. 2a ed. Saunder and co.

BASKIN, D.G., GOLDING, D.W. (1968)- Morphological evidence for a primitive neuroendocrine complex in polynoids (Polychaeta). Am. Zool. 8, 107.

BERJON, J.J. (1965). Application de la culture organotypique sur milieux artificiels à la discrimination des fonctions endocrines des ganglions cérébroïdes du Lombricien Eisenia foetida (Sav). Compte rendu hebdomadaire des séances de l'Académie des Sciences, Paris, 260D, 6212-6214.

BERJON, J.J. (1968). Neurosécrétion et sexualisation somatique chez Eisenia foetida (Sav.), Thèse 3<sup>e</sup> cycle, Fac. Sc. Bordeaux.

BERJON, J.J., MEUNIER, J.M. (1968). Contribution à l'étude des caractères cytophysiologiques des ganglions cérébroïdes d'Eisenia foetida Sav. examinés dans diverses conditions expérimentales. Ann. Endocr. 29, 433-447.

BERRIL, N.J. (1952). Regeneration and bulding in worms. Biol. Rev. 27, 401-438.

BIANCHI, S. (1963 a). Sulla presenza di proteine di tipo cistinico o cisteinico nel neurosecreto delle cellule nervose dei gangli di un Lumbricidae. Archivio Zoologico Italiano, 48, 313-321.

BIANCHI, S. (1963 b). Prime indagini istochimiche sul neurosecreto delle cellule nervose dei gangli di Octolasion complanatum Dugès. Arch. Zool. Ital., 48, 323-327.

BIANCHI, S. (1974). A histochemical investigation of neurosecretion in Enchytraeus albidus (Enchytraeidae). General and comparative Endocrinology, 22, 454-458.

BILELLO, A.A., POSTWALD, H.E. (1974). A cytological and quantitative study of neoblasts in the naid Ophidonais serpentina (Oligochaeta).

Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen, 174, 234-249.

BOILLY, B. (1969). Sur l'origine des cellules régénératrices chez les Annélides Polychètes. Archives de Zoologie expérimentale et générale., 110, 127-143.

BOILLY, B. (1974). The role of the brain on caudal regeneration of Nereis diversicolor O.F. Müller (Annelida, Polychaeta). Wilhelm Roux'Archiv. für Entwicklungsmechanik der Organismen, 174, 95-210.

BOUC-LASALLE, A.M. (1968). La cicatrisation des plaies de la paroi du corps chez le Lombricien Eisenia foetida Sav. en présence et en l'absence d'innervation. C.R. Acad. sc., 267, 2167-2169.

BOULOT, M., GALLISSIAN, A. (1960). Diapauses spontanée et provoquée chez le Lumbricidae Eophila dollfusi Téttry. C.R. Acad. Sc. Paris, 250, 3403-3404.

BRANDENBURG, J. (1956). Neurosekretorische zellen des Regenwurms. Naturwissenschaften, 43, 453.

BURKE, J.M. (1974 a). Wound-healing in Eisenia foetida (Oligochaeta). II. A fine structural study of the role of the epidermis. Cell and Tissue. Research, 154, 61-82.

BURKE, J.M. (1974 b). Wound-healing in Eisenia foetida (Oligochaeta). III.A fine structural study of the role of non-epidermal tissues. Cell and Tissue Research, 154, 83-102.

BURKE, J.M. (1974 c). Wound-healing in Eisenia foetida (Oligochaeta) I. Histology and <sup>3</sup>H-thymidine radioautography of the epidermis. Journal of experimental zoology, 188, 49-64

CAMERON, M.L., STEELE, J.E. (1959). "Simplified aldehyde-fuchsin staining of neurosecretory cells". Stain Technology: 34, 265-266.

CARDON, C., DURCHON, M., PORCHET, M. (1981). Purification of the brain hormone of Nereis diversicolor and Perinereis cultrifera (Annelida, Polychaeta) by high-pressure liquid chromatography (HPLC).

CARDON, C., MARCEL, R. (1976). Demonstration de la nature peptidique du facteur inhibiteur de la régénération céphalique chez le Lombricien Eisenia foetida Sav. f. typica. (Annélide, Oligochète). C.R. Acad. sci., série D., 282, 657-658.

CASANOVA, G. (1955). Influence du prostomium sur la régénération caudale chez Platynereis massiliensis (Monquin-Tandon). C.R. Acad. Sci. Paris, 240. 1814-1816.

CHAPRON, C. (1965). Le probleme de l'origine des blastocytes au cours de la régénération antérieure chez le lombricien Eisenia foetida unicolor. C.R. hebdom. séances Acad. Sci. Paris, D, 261, 1727-1730.

CHAPRON, C. (1966). Etude au microscope électronique, chez le lombricien Eisenia foetida de la structure du tissu cicatriciel au début de la régénération antérieure. Journal de Microscopie, 5, 273-176.

CHAPRON, C. (1969 a). Phénomènes de dédifférenciation au cours de la régénération céphalique chez le lombricien Eisenia foetida unicolor. C.R. hebdom. des séances de l'Académie des Sciences, Paris, D, 269, 187-190.

CHAPRON, C. (1969 b). Mecanisme nerveux au cours de la régénération céphalique chez le lombricien Eisenia foetida unicolor. Compte rendue hebdomadaire des sciences de l'Academie des Sciences, Paris, D, 269, 604-607.

CHAPRON, C. (1969 c). Contribution à l'étude histologique e infrastructurale de la régénération céphalique chez le Lombricien E. foetida Sav. Thèse Doct. Sci. Nat. Bordeaux.

CHAPRON, C. (1970 a). Contribution à l'étude du determinisme de la régénération caudale chez le Lombricien Eisenia foetida. C.R. Acad. Sci. Paris, 270, 2318-2321.

CHAPRON, C. (1970 b). Etude histologique infraestruturale de la régénération céphalique chez le Lombricien Eisenia foetida unicolor (Sav). Ann. Embriol. Morphog., 3, 235-250.

CHAPRON, C. (1970 c). Régénération céphalique chez le Lombricien Eisenia foetida unicolor: structure, origine et rôle du bouchon cicatriciel. Archives de zoologie expérimentale et generale, 111, 217-227.

CHAPRON, C. (1970 d). Différenciation infrastructurale d'epiderme et du systeme nerveux au cours de la régénération céphalique chez le Lombricien Eisenia foetida. C.R. hebd.séances Acad. Sei. Paris, D, 270, 973-976.

CHAPRON, C. (1970 e). Structure et évolution des cellules de régénération mésodermique dans les jeunes régénérats du Lombricien Eisenia foetida Sav. Journal de Microscopie, 9, 347-354.

CHAPRON, C. (1971 a). Etude de l'origine et de la différenciation du pharynx au cours de la régénération chez l'Annélide Eisenia foetida. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 25, 439-455.

CHAPRON, C. (1971 b). Relations entre les événements morphogénétiques de la régénération et les synthèses d'acides ribonucléiques et de protéines. Etude chez Eisenia foetida (Oligochaeta). C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. Paris, D. 272, 859-862.

CHAPRON, C. (1972). Etude des modifications de la surface des cellules qui interviennent dans la régénération d'Eisenia foetida (Annélide, Oligochète). C.R. Acad. Sc. Paris, 274, serie D. 3417-3420.

CHAPRON, C., CHAPRON, J. (1972). Influence des amines biogènes et de leurs inhibiteurs sur la régénération étudiée chez l'Annélide Eisenia foetida, C.R. Acad. Sci. Paris, 274, 412-414.

CHAPRON, C., CHAPRON, J. (1974). Mise en évidence "in vivo" d'une action antimitotique de la 5'AMP sur les cellules de régénération des Lombriciens. C.R. Acad. Sci. PARIS, 278, 2967-2970.



CHAPRON, C., CHAPRON, J. (1976). Changes in the free adeny-  
late Nucleotide Pattern in relation to the longitudinal axis  
of Earthworms and during their Regeneration. Jour. Exper. Zool.,  
195, no 1. 171 - 177

CHAPRON, C., VALEMBOIS, P. (1969). Etude de quelques aspects  
cytologiques communs a la régénération céphalique et aux he-  
terogreffes chez les lombriciens. Comptes rendus 86 Congress  
A.F.A.S. 1967 Bordeaux, 4, 1978-1979.

CLARK, R.B., BONNEY, D.G. (1960). Influence of the supra-oeso-  
phageal ganglion on posterior regeneration in Nereis diversi-  
color. Journal of Embryology and Experimental Morphology. 8,  
112-118.

CLARK, R.B., CLARK, M.E. (1959). Role of the supraesophageal  
ganglion during the early stages of caudal regeneration in  
some errant polychaetes. Nature, 183, 1834-1835.

CLARK, R.B., EVANS, S.M. (1961). The effect of delayed brain  
extirpation and replacement on caudal regeneration in Nereis  
diversicolor. J. Embryol. Exp. Morphol. 9, 97-105.

CORNEC, J.P., COULOMB-GAY, R. (1976). Aspects histologiques,  
ultrastructuraux et histochemiques des tissus de l'oligoché-  
te Eiseniella tetraedra et de l'hirudinée Erpobdella octocula-  
ta après amputation. Bulletin de la Société Zoologique de Fran-  
ce, 101, 141.

COULON, J., BESSONE, R. (1979). Radioautographie localization of indolamines and catecholamines neurons in the nervous systems of Owenia fusiformis (Polychaete Annelid). Cell Tissue Res. , 198, 95-104.

DEUSE-ZIMMERMANN, R. (1960). Vergleichende Untersuchungen über Neurosekretion bei Enchytraeidae, Tubificidae und Naididae. Zeitschrift für zellforschung und mikroskopische Anatomie, 52, 801-816.

DE VRIES-SCHOUMACKER, H. (1974). Approche morphologique des systèmes neuro-endocriniens cellules neurosécrétrices et cellules aminergiques chez un Oligochète Eisenia foetida. Journal de Physiologie, 68, 3B.

DE VRIES-SCHOUMACKER, H. (1976). Ultrastructure des cellules neurosécrétrices d'un ganglion de la chaîne nerveuse ventrale d'Eisenia foetida (Sav.) (Annélide Oligochète). Arch. Biol., 87, 191-214.

DE VRIES-SCHOUMACKER, H. (1977). Fluorescence and ultrastructural localization of aminergic neurons in the nerve cord of Eisenia foetida (Annelida-Oligochaeta). Cell and Tissue Research, 185, 351-360.

DE VRIES-SCHOUMACKER, H. (1978). Ultrastructure des cellules neurosécrétrices et aminergiques de la chaîne nerveuse chez Eisenia foetida (Oligochète terricole). General and Comparative Endocrinology, 34, 102-103.

DEY, M., NANDA, D.K. (1975). Histological studies on the secretory neurones of the suboesophageal ganglion of Pheretima posthuma. Zoologischer Anzeiger, 194, 42-46.

DHAINAUT-COURTOIS, N., WAREMBOURG, M. (1967). Etude des cellules sécrétrices de la chaîne nerveuse de Nereis pelagica L. (Annélide Polychète). Gen. Comp. Endocrinol. 9, 276-286.

DOGRA, G.S. (1968). Studies "in situ" on the neurosecretory system of the earthworm, Pheretima posthuma. Journal of Zoology, London, 156, 109-118.

DURCHON, M. (1951). L'ablation du prostomium provoque chez les Néréidiens la maturation précoce des produits génitaux mâles. C.R. Acad. Sc., 232, 442-443.

DURCHON, M. (1952). Recherches expérimentales sur deux aspects de la reproduction chez les Annélides polychètes: l'épitoquie et le stolonisation. Annales des sciences Naturelles, Paris, Zoologie, 11, (14), 117-206.

DURCHON, M. (1956). Influence du cerveau sur les processus de régénération caudale chez les Nereidiens. Arch. Zool. Exp. Gen. 94, 1-9.

DURCHON, M. (1967). L'Endocrinologie des Vers et des Mollusques. Masson et Cie., Paris.

DURCHON, M., DHAINAUT, A., PORCHET, M. (1978). Endocrine control of sexual reproduction in Polychaetes Annelids. Comparative Endocrinology. 29-32.

DURCHON, M., JOLY, P. (1978). L'endocrinologie des Invertébrés. 235 p., P.U.F. Paris.

DURCHON, M., MARCEL, R. (1962). Influence du cerveau sur la ré génération postérieure chez Nereis diversicolor O F. Müller (Annélide Polychète). C.R. Acad. Sc. 253, 318-320.

DURCHON, M., PORCHET, M. (1971). Premières données quantitatives sur l'activité endocrine du cerveau des Néréidiens au cours de leur cycle sexual. Gen. Comp. Endocr., 16, 555-565.

DURCHON, M., SCHALLER, F. (1963). Application de la méthode de culture organotypique aux recherches endocrinologiques chez les Annélides Polychètes. C.R. Acad. sci. Fr., 256, 5615-5617.

FALCK, B., HILLARP, N. (1962). Fluorescence of catecholamine and related compounds condensed with formaldehyde. Journal of Histochemistry and Histochemistry, 10, 348-354.

FAUSTO, N., BUTCHER, F.R. (1976). Cyclic nucleotides levels in regenerating liver. Biochem. Biophys. Acta, 428, 702-706.

FERRER de MORAIS, P., HERLANT-MEEWIS, H., DHAINAUT-COURTOIS, N. (1979). ultrastructure des Cellules neurosécrétrices Peptidergiques des ganglions cérébroïdes d'Eisenia foetida. Archives de Biologie, 90, 83-112.

FLOREY, E. (1967). Neurotransmitters and modulators in the animal kingdom. Federation Proceedings, 26, 1164-1178.

FRANQUINET, R., COULON, J. (1980). Régénération et nucléotides cycliques. Ann. Biol. T. XIX. Fasc. 2.

GABE, M. (1953). Sur quelques applications de la coloration par la fuchsine-paraldéhyde. Bull. Micr. Appl. 3, 153-162.

GABE, M. (1968). Techniques histologiques. Masson et C<sup>ie</sup>. Editeurs. Paris.

GALLISSIAN, A. (1963). Action des ganglions cérébroïdes sur la diapause et la régénération d'Eophila dollfusi Tétary (Lumbricide). Compt. r.h. seances Acad. Science. Paris. Tomo 256, 1158-1159.

GALLISSIAN, A. (1973). Rôle des cellules neurosécrétrices dans le déterminisme de la diapause et de la régénération postérieure chez le Lombricide Eophila dollfusi Tétary. Compt. r. h. des seances Acad. Sci. Paris., 276 D, 2721-2723.

GALLISSIAN, A., GIRARDIE, J. (1972). Etude histologique et ultrastructurale des cellules nerveuses du cerveau d'Eophila do-  
llyfusi Tétay (Lumbricidae). Compte rendu hebdomadaire des  
séances de l'Académie des Sciences, Paris, 275 D, 79-82.

GATES, G.E. (1941). Further notes on regeneration in a tropi-  
cal earthworm Perionyx excavatus E. Perrier, 1872, J. exp.  
zool., 88, 161-185.

GATES, G.E. (1948). On segment formation in normal and regene-  
rative growth of earthworms. Growth, 12. 165-180.

GATES, G.E. (1950). Regeneration in an earthworm, Eisenia foe-  
tida. III. Regeneration from simultaneous anterior and poste-  
rior transections. Biol. Bull. 99, 425-438.

GERSCH, M., UDE, J. (1967). Elektronenmikroskopische Unter-  
suchungen zur Dynamik neurosekretorischen zellen von Enchy-  
traeus oligochaeta). Z. Zellforsch. 81, 374-389.

GERSCH, M., UDE, J. (1970). Licht-und elektronenmikroskopische  
Untersuchungen über die Beeinflussung der Dynamik neurosekre-  
torischen zellen von Enchytraeus (Oligochaeta) durch Aktinomy-  
cin D. Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Ana-  
tomie, 107, 87-103.

GERSCH, M., UDE, J. (1971). Untersuchungen über die Beeinflussung  
der substrukturen neurosekretorischen zellen von Enchytraeus.

.../...

.../...

durch Puromycin. Zellforschung und mikroskopische Anatomie, 114, 95-105.

GERSCH, M., WOHLRABE, (1965). Experimentelle untersuchungen über die Beziehungen Zwischen Neurosekretion und Regeneration bei Enchytraeus. Zoologische Jahrbücher, Zoologie und Physiologie, 71, 393-413.

GOLDING, D.W. (1967 a). Regeneration and growth control in Nereis. I. Growth and regeneration. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 18, 67-77.

GOLDING, D.W. (1967 b). Regeneration and growth control in Nereis. II. An axial gradient of growth potentiality. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 18, 79-90.

GOLDING, D.W. (1967 c). Neurosecretion and regeneration in Nereis. I. Regeneration and the rôle of the supraoesophageal ganglion. General and Comparative Endocrinology, 8, 348-355.

GOLDING, D.W. (1967 d). Neurosecretion and regeneration in Nereis. II. The prolonged secretory activity of the supraoesophageal ganglion. General and Comparative Endocrinology, 8, 356-367.

GOLDING, D.W. (1967 e). Endocrinology, regeneration and naturalization in Nereis. Biological Bulletin of the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Mass, 133, 567-577.

GOLDING, D.W. (1974 a). Regeneration and growth control in Nereis. III. Separation of wound healing and segment regeneration by experimental endocrine manipulation. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 32, 99-109.

GOLDING, D.W. (1974 b). A survey of neuroendocrine phenomena in non-artropod invertebrates. Biol. Rev. 49, 161-224.

GOLDING, D.W., WHITTLE, A.C. (1974). Neurones with "secretory and feet" a possible neuroendocrine complex in Nereis Tissue and Cell, 6, 599-613.

GOLDING, D.W., WHITTLE, A.C. (1975). Secretory and feet, extracerebral cells and cerebral sense organs in certain limnicole Oligochaete Annelids. Tissue and Cells, 7, 469-484.

GOLDING, D.W., WHITTLE, A.C. (1977). Neurosecretion and related phenomena in Annelids. International Review of Cytology, supp. 5, 189-302.

GOSS, M. (1969). Principles of regeneration. 287 p., Academic Press, New York.

GRASSE, P.P. (1959). Traité de Zoologie, Vol. V. Masson et cie., Paris.



HAGADORN, I.R. (1966). Neurosecretion in the Hirudinea and its possible role in reproduction. *American Zoologist*, 6, 252-261.

HARMS, J. W. (1948). Über ein inkretorisches cerebralorgan bei Lumbriciden, sowie Beschreibung eines verwandten organs bei drein neuen Lycastis-Arten. *Roux'Arch. Entw. Mech Organ.* 143, 332-346.

HAUENSCHILD, C. (1960 a). Abhängigkeit der Regenerationsleitung von der inneren sekretion in Prostomium bei Platynereis dumerilii *Z. Naturforsch.*, 15 b, 52-55.

HAUENSCHILD, C. (1960 b). Lunar periodicity coldspring Harbor Symposia in Quantitative Biology, 25, 491-497.

HAUENSCHILD, C. (1963). Postembryonale Entwicklungsteuerung durch ein Gehirnhormon bei Platynereis dumerilii. *Verhandl. Deutsch. Zool. Gessellseh. (München)*, 3-120.

HAUENSCHILD, C. (1975). Die Beiteiligung endokriner Mechanismen auf der geschlechtlichen Entwicklung und Fortpflanzung von Polychaeten. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, 67, 292-308.

HERLANT-MEEWIS, H. (1946). Contribution à l'étude de la régénération chez les Oligochètes. Reconstitution du germen chez Lumbricillus lineatus (Enchytraeides). *Archives de Biology*, 57, 197-206.

HERLANT-MEEWIS, H. (1954). Croissance et reproduction du Lombricien Eisenia foetida. Ann. Soc. Zool. Belgique. 85, 119-151.

HERLANT-MEEWIS, H. (1955). Neurosécrétion chez les Oligochètes. Bull. Acad. Roy. Belg., cl. sci. (5) 41, 500-506.

HERLANT-MEEWIS, H. (1956). Reproduction et neurosécrétion chez Eisenia foetida (Sav.). Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique. 87, 151-183.

HERLANT-MEEWIS, H. (1959). Phénomènes neuro-sécrétoires et sexualité chez Eisenia foetida. Compte ren. h. séances de l'Académie sciences Paris. 248, 1405-1407.

HERLANT-MEEWIS, H. (1962). Neurosecretory phenomena during regeneration of nervous centres in Eisenia foetida. Memoirs, Society for Endocrinology, 12, 267-274.

HERLANT-MEEWIS, H. (1969 a). Evolution de l'appareil génital d'Eisenia foetida au cours du jeûne, de la régénération postérieure et à la suite de l'ablation des ganglions nerveux. Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique, 96, 189-240.

HERLANT-MEEWIS, H. (1966 b). Les cellules neurosécrétrices de la chaîne nerveuse d'Eisenia foetida. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 69, 319-325.

HERLANT-MEEWIS, H. (1971). Le rôle du système nerveux dans la cicatrisation chez Eisenia foetida. Congr. Eur. Endocrin. Comp. 69, Montpellier.

HERLANT-MEEWIS, H. (1975). Neurosecretory phenomena during reproduction in Oligochaeta. 57-63. In "Intersexuality in the animal Kingdom". Reimboth, R. (ed.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, and New York.

HERLANT-MEEWIS, H. (1977). Phénomènes neurosécrétoires et amines chez les Annélides. Bulletin de l'Académie Royale de Belgique classe des Sciences, 63, 240-247.

HERLANT-MEEWIS, H., DE VRIES-SCHOUMACKER, H., FERRER de MORAIS, P. (1980). Etude ultrastructurale des cellules neurosécrétrices d'Eisenia foetida (Lumbricidae, Oligochaeta). Pedobiologia. Vol. 20, no 3.

HERLANT-MEEWIS, H., DELIGNE, J. (1965). Influence of the nervous system on regeneration in Annelids. 228-239. In "Regeneration in animals and related problems". Kiortis, V. and Trampusch, H. (eds.) Amsterdam, North-Holland Publishing Company.

HERLANT-MEEWIS, H., GALLARDO, S. (1965). Phénomènes neurosécrétoires au cours de la régénération postérieure d'Eisenia foetida. Gen. Comp. Endocrinol. 5, 681.

HILL, S.D. (1972). Caudal regeneration in absence of a brain in two species of sedentary polychaetes. J. Embryol. Exp. Morph. 38, 667-680.

HOFFMAN, D.K. (1976). Regeneration and endocrinology in the Polychaete Platynereis dumerilii. An experimental and structural study. Wilhelm Roux's Arch., 180, 47-71.

HUBL, H. (1953). Die inkretorischen zellelemente in Gehirn der Lumbriciden. Wilhelm Roux's Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen, 146, 421-432.

HUBL, H. (1956 a). Ein neuer type neurosekretorischen zellen in unterschlundganglion der Regenwürmer. Naturwissenschaften, 12, 284.

HUBL, H. (1956 b). Über die Beziehungen der Neurosekretion zum Regenerationsgeschehen bei Lumbriciden nebst Beschreibung eines neuartigen neurosekretorischen zelltyps in Unterschlundganglion. Wilhelm Roux's Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen, 149, 73-87.

ITO, Y., KURIYAMA, H., TASHIRO, N. (1971). Effects of catecholamines on the neuromuscular junction of the somatic muscle of the earthworm Pheretima communissima. Journal of Experimental Biology, 54, 167-186.

JAMIESON, N.G.M. (1981). The ultrastructure of the Oligoechaeta. Academic Press. London.

JOLY, R. (1962). Les glandes cérébrales, organes inhibiteurs de la mue chez les Myriapodes chilopodes C.R. Acad. Sc. Paris, 254, 1679-1681.

JUBERTHIE, C., MESTROV, M. (1965 a). Régénération postérieure en milieu humide et activité neurosécrétoire de la chaîne nerveuse chez Eophila pyrenaica (Olig. Lumbricidae). C.R. Acad. Sci., 260, 991-994.

JUBERTHIE, C., MESTROV, M. (1965 b). Régénération postérieure en l'absence de cerveau et des segments antérieurs chez Eisenia foetida. C. R. Acad. Sc. Paris. 260 D., 991-994.

KEELY, S.L., LINCOLN, T.M. (1978). On the question of cyclic GMP as the mediator of the effects of acetylcholine in the heart. Biochim. Biophys. Acta. 543, 251-257

KNOWLES, F. (1965). Neuroendocrine correlations at the level of the ultrastructure. Archives d'Anatomie microscopique et de Morphologie expérimentale, 54, 343-357.

KNOWLES, F., BERN, H.A. (1966). Function of neurosecretion in endocrine regulation. Nature, London, 210, 271-272.

KRECKER, F.H. (1910). Some phenomena of regeneration in Lim-  
nodrilus and related forms. Zeitschrift für Wissenschaftliche  
Zoologie, 95, 383-449.

LATTAUD, C. (1973). Auto différenciation ovarienne chez l'An-  
nélide Oligochète Eisenia foetida f. typica Sav. démontrée  
au moyen de la culture organotypique. C.R. Acad. Sci. Paris.  
276 D, 1737-1740.

LATTAUD, C. (1980). Demonstration by organ culture of a cere-  
bral hormone stimulating the secretion of testicular androgen  
in the Oligochaete Annelid, Eisenia foetida f. typica Sav. In-  
ternational Journal of Invertebrate Production. 2, 23-36.

LAVERACK, M.S. (1963). The Physiology of Earthworms. Pergamon  
Press. Oxford.

LE MOIGNE, A., MARTELLY, F., FRANQUINET, R. (1976). Variations  
des synthèses d'ARN et de nucléotides cycliques au cours de  
la régénération des Planaires Bull. Soc. Zool. France, 101  
sup., 3, 29-33.

LENDER, T.H. (1974). La Régénération animals. Coll. Sup., 192 p,  
P.U.F. Paris.

LENICQUE, P.M. (1976). Contrôle de la régénération de petits  
morceaux de Planaires Dugesia tigrina par les nucléotides AMP  
et GMP. C.R. Acad. Sci. Paris, 283, 1317-1319.

LENICKE, P.M.; LUNDBLAD, M. (1966 a). Promoters and inhibitors of development during regeneration of the hypostome and tentacles of Hydra littoralis. Acta. Zool., 47, 277-287.

LENICKE, P.M., LUNDBLAD, M. (1966 b). Promoters and inhibitors of development during regeneration of the hypostome and tentacles of Clava squamata. Acta Zool., 47, 185-195.

LIEBMANN, E. (1942). The correlation between sexual reproduction and regeneration in a series of Oligochaeta. J. Exp. Zool. 91, 373-389.

MACKMAN, M.H. (1971). Conditions leading to enhanced response to glucagon epinephrine or prostoglandin by adenylate cyclase of normal and malignant cultured cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68, 2127-2130.

MAISSIAT, J. (1965). Influence de l'ablation des ganglions cérébroïdes sur la régénération postérieure chez le Lombricien Allolobophora chlorotica Sav. Relation avec la diapause. Compt rendu hebdom des séances de l'Académie des sciences, Paris, 261 D, 1749-1751.

MANSOUR, T.E., SUTHERLAND, E.W., RALL, T.W., BUEDING, E. (1960). The effect of serotonin in the formation of adenosine 3'-5' phosphate by tissues parties from the liver fluque Fasciola hepatica. J. Biol. Chemistry, 235, 466-470.

MARCEL, R. (1967 a). Inhibition de la régénération antérieure chez Eisenia foetida f. typica Sav. (Annélide Oligochète). Bull. Soc. Zool. France, 92, 345-350.

MARCEL, R. (1967 b). Rôle du système nerveux dans l'inhibition de la régénération antérieure chez Eisenia foetida f. typica Sav. (Annélide Oligochète). C.R. Acad. Sci., 265, 693-694.

MARCEL, R. (1968). Effects inhibiteurs et trophique dans la régénération céphalique de Eisenia foetida f. typica (Sav.) Annélide Oligochaète, Lombricien). Ann. Embryol. Morphol., 1, 417-425.

MARCEL, R. (1970 a). Inhibition de la régénération caudale chez Eisenia foetida f. typica Sav. (Annélide Oligochète). Ann. Embryol. Morphol. 3, 439-446.

MARCEL, R. (1970 b). Etude "in vivo" de la inhibition céphalique chez Eisenia foetida f. typica Sav. (Annélide Oligochète). Ann. Embryol. Morphol. 3, 329-335.

MARCEL, R. (1970 c). Etude "in vitro" de la régénération céphalique d'Eisenia foetida f. typica Sav. (Annélide Oligochète). Ann. Biol., 9, 527-535.

MARCEL, R. (1972 a). The stages of the caudal regeneration in Eisenia foetida f. typica, Annelida Oligochaeta. Bull. Soc. Zool. Fr. 97 (4) (Reed. 1973). 699-704.



MARCEL, R. (1972 b). Action des substances inhibitrices spécifiques sur le blastème de régénération chez Eisenia foetida f. typica Sav. (Annélide Oligochète). Ann. Embryol et Morphog., Vol. 5 (4); 285-295.

MARCEL, R. (1972 c). Action des substances inhibitrice et trophique sur les cycles sécrétoires des neurones de la chaîne nerveuse ventrale au cours de la régénération chez Eisenia foetida Sav. f. typica (Annélide Oligochète). Gen. Comp. Endocrinol. 21, 45-59.

MARCEL, R. (1973 a). Cycles sécrétoires des cellules de la chaîne nerveuse au cours de la régénération chez Eisenia foetida Sav. f. typica (Annélide Oligochète). Gen. Comp. Endocrinol. 21, 30-44.

MARCEL, R. (1973 b). The effect of inhibitory and of trophic substances on neuronal secretory cycles of the ventral nervous chain during regeneration of Eisenia foetida f. typica Annelida Oligochaeta. Gen. Comp. Endocrinol. 21(1), 45-59.

MARCEL, R. (1980). L'auto-inhibition au cours de la régénération. L'Année Biologique. 19 (2), 217-229.

MARCEL, R., CARDON, C. (1979). Partial purification and characterization of the peptide which inhibits cephalic regeneration in Eisenia foetida Sav. (Oligochaeta, Annelida). Comp. Biochem. Physiol., 63 B, 233-237.

MARTOJA, R., MARTOJA-PIERSON, M. (1970). Técnicas de Histología Animal. Toray-Masson. Barcelona.

Mc WILLIAMS, H.K., KAFATOS, F.C. (1968). Hydra viridis: Inhibition by the basal disk of basal disk differentiation. Science, 159, 1246-1247.

Mc WILLIAMS, H.K., KAFATOS, F.C., BOSSERT, W.H. (1970). The "feet-back" inhibition of basal disk regeneration in Hydra has a continuously variable intensity. Biol. Bull., 23, 380-398.

MICHON, J. (1954). Contribution expérimentale à l'étude de la biologie des Lumbricidae. Les variations pondérales au cours des différentes modalités du développement post-embryonnaire. THESE. Poitiers.

MICHON, J. (1962). La neurosécrétion pendant la régénération postérieure chez Allolobophora terrestris Sav. f. typica. C.R. Acad. Sc. 255, 3253-3254.

MICHON, J., ALAPHILIPPE, F. (1959). Contribution à l'étude de la neurosécrétion chez les Lumbricidae. C.R. Acad. Sci. 249, 835-837.

MICHON, J., MAISSIAT, J., ANGEVAIN, A. (1964). Contribution à l'étude de la neurosécrétion chez le Lumbricien Eisenia tetraedra f. typica. C.R. Acad. Sc., 259, 1248-1249.

MILL, P.J. (1978). Physiology of Annelids. Academic Press. London.

MIN JA SONG, SAUSSEY, M. (1976). Etude de la régénération caudale chez Nicodrilus giardi (Ribaucourt) Oligochète, Lumbricidae): Ces des vers amputés a l'issue de la diapause estivale. C.R. Acad. Sci. Paris, 282, D., 389-391.

MOMENT, G.B. (1953). On the way a common earthworm, Eisenia foetida, grows in length. J. Morph. 93; 489.

MOMENT, G.B. (1975). On the nonhormonal control of the termination of regeneration. Growth 39 (2), 233-240.

MOMENT, G.B. (1979). Growth, Posterior regeneration and segment number in Eisenia foetida. Megadrilogía, Vol. 3 (10) 167-176.

MOMENT, G.B., MANN, P. (1980). A contribution to the study of growth limitation in earthworm. Pedobiologia 20, (3).

MULLER, W.A. (1969). Die sterverung der morphogenetischen Fliesgleichgewichts in den Polypen von Hydractinia echinata. II. Chemischanalytische Untersuchungen. Wilhelm Roux's Archiv, 163, no 4, 357-374.

MYHRBERG, H.E. (1972). Ultrastructural localisation of monoamines in the central nervous system of Lumbricus terrestris (L) with remarks on neurosecretory vesicles. Zeitschrift für zell-

.../...

forschung und mikroskopische Anatomie, 126, 348-362.

NESTLER, E.J., BEAM, K.G., GREENGARD, P. (1978). Nicotinic cholinergic stimulation increase cyclic GMP levels in Vertebrate skeletal muscle. Nature, 275, 451-453.

OLIVE, P.J.W. (1974). Cellular aspects of regeneration hormone influence in Nereis diversicolor. J. Embryol. Exp. Morph. 32, 111-131.

OMODEO, P. (1948). Il letargo nei Lombrichi. Boll. Zool. Torino, 15, 11-18.

OOSAKI, T. (1966). Observations on the ultrastructure of nerve cells in the brain of the earthworm Eisenia foetida, with special reference to neurosecretion. Zeitschrift für zellforschung und mikroskopische Anatomie, 72, 534-542.

OTREMBA, P. (1961). Beobachtungen an neurosekretorischen zellen des regenwurmes (Lumbricus spec.) Z. zellforsch. 54, 421-436.

PELLEGRINO DE IRALDI, A., DE ROBERTIS, E. (1962). Electronmicroscopic study of a special neurosecretory neuron in the nerve cord of the earthworm U7. In fifth International Congress for Electron Microscopy, 2, 190-191. Academic Press.

PETZOLD, H. (1963). Elektronenmikroskopische untersuchungen am bauchmark und oterschlundganglion von Lumbricus terrestris L. Protoplasma, 56, 553-582.

PORCHET, M. CARDON, C. (1972). Regulation de l'activité endocrine cérébrale chez les Nereidae (Annélides Polichètes). C.R. Acad. Sci. Paris. 275 D, 2375-2378.

PUCCIA, E., DURANTE, M. (1973). The compensatory regeneration of the operculum of Hydroides norvegica: identification of the inhibiting substance. J. exp. zool., 184, 1-6.

ROBERTSON, H.A.; OSBORNE, N.N. (1979). Putative neurotransmitters in the Annelid central nervous system: presence of 5-hydroxytryptamine and octopamine-stimulated adenylated cicla ses. Comparative Biochemistry and Physiology, 64 C, 7-14.

RÖHLICH, P., AROS, B., VIGH, B. (1962). Elektronenmikroskopische untersuchung der neurosekretion in cerebral-ganglion des regenwurmes (Lumbricus terrestris). Z. Zellforsch. 58, 524-545.

ROSE, S.M. (1955). Specific inhibition during differentiation. N.Y. Acad. Sci. Am., 60, 1136-1159.

ROSE, S.M. (1966). Polarized inhibitory control of regional differentiation during regeneration in Tubularia. II Separation of active materials by electrophoresis. Growth, 30, 429-44

ROSE, S.M. (1970) Regeneration. Appleton-Century Crofts. New York, 264 pp.

RUDE, S.S., LINDER, H.J. (1964). The effect of the brain on spermatogenesis in the Oligochaeta Eisenia foetida. American Zoologist, 4, 327.

SAUSSEY, M. (1961). Possibilité de régénération caudale chez Allolobophora icterica (Savigny) (Oligochète, Lumbricidae) en dehors des périodes de diapause. C.R. Acad. Sci. Paris, 255, 1363-1364.

SAUSSEY, M. (1962). Influence de l'ablation des centres nerveux antérieurs sur la régénération postérieure d'Allolobophora icterica sav. (Oligochète, Lumbricidae). C.R. Acad. Sci. 255, 1363-1364.

SAUSSEY, M. (1964). Importance du niveau d'amputation dans le déterminisme de la diapause et de la régénération caudale chez Allolobophora icterica Sav. (Oligochète), Lumbricidae). C.R. Acad., 258, 4345-4347.

SAUSSEY, M. (1966). Contribution à l'étude des phénomènes de diapause et de régénération caudal chez Allolobophora icterica sav. (Oligochète Lumbricidae). Mémoires de la Société Linnée de Normandie section de Zoologie, 3, 11-158.

SAUSSEY, M. (1970). Quelques aspects de la sexualité chez les Lumbriciens. *Bolletín de la Societé Zoologique de France*, 95, 479-489.

SAUSSEY, M. (1973). Sur deux aspects du développement post-embryonnaire d'Allolobophora terrestris (Savigny) f. typica (Oligochète, Lumbricidae). *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. 276, série D. 1341-1344.

SAYLES, L.P. (1927). Origin of the mesoderm and behaviour of the nucleolus in regeneration in Lumbriculus. *Biological Bulletin Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Mass.* 52, 278-313.

SCHALLER, H.C. (1976). Head regeneration in Hydra is initiated by the release of head activator and inhibitor. *Wilhelm Roux's Archives*, 180, 287-296.

SCHARRER, B. (1937) Über sekretorisch tätige nervenzellen bei wirbellosen tieren. *Naturwissenschaften*, 25, 131-138.

SCHARRER, B. (1968). Neurosecretion. XIV. Ultrastructural study of sites of release of neurosecretory material in blattarian insects. *Z. Zellforsch*, 89, 1-16.

SCHARRER, E., BROWN, S. (1961). Neurosecretion. XII. The formation of neurosecretory granules in the earthworm Lumbricus terrestris L. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 4, 530-540.

SCHMIDT, P. (1918). Anabiosis of the earthworm. J. exp. Zool., 27, 57-72.

SCHOTTE, O.E. (1926). Système nerveux et régénération chez le Triton. Rev. Suisse Zool., 33, 1-211.

SCULLY, U. (1964). Factors influencing the secretion of regeneration-promoting hormone in Nereis diversicolor. Gen. and Comp-Endoc., 41, 91-98.

SMITH, S.D. (1964). Time relationships of the specific inhibitors of caudal regeneration in Clymenella torquata. Proc. Soc. Exp. Biol. G. Med., 116, 83-85.

STEELE, V.E.; LANGE, C.S. (1977). Characterization of an organ specific differentiator substance in the planarian Dugesia etrusca. J. Embryol. exp. Morphol., 37, 159-172.

STEPHAN-DUBOIS, F. (1954). Les néoblastes dans la régénération postérieure des Oligoéchètes nicodrilés. Bulletin biologique de la France et de la Belgique, 88, 181-247.

STEPHAN-DUBOIS, F. (1956). Migration et différenciation des néoblastes dans la régénération antérieure de Lumbriculus variegatus. C.R. Soc. Biol., Paris, 150, 1239-1242.

STEPHAN-DUBOIS, F. (1980). Influence of cephalic region on posterior Regeneration of the annelid Tubifex tubifex, C.R. Acad. Sc., 291, D. 413-416.



TABAN, C.H., CATHIENI, M., SHORDERET, M. (1978). Cyclic AMP and noradrenaline fluctuation in regenerating newt tissues. *Nature*, 271, 470-471.

TAKEUCHI, N. (1965 a). Neurosecretory elements in the control nervous system of the earthworm. *Science Reports of the Tôhoku University*, séries 4, 31, 105-116.

TAKEUCHI, N. (1965 b). Some histochemical reactions of neurosecretory cells in the cerebral ganglion of the earthworm. *Science Reports of the Tôhoku University*, series 4, 31, 1-11.

TAKEUCHI, N. (1967). On the structure of neurosecretory cells in the cerebral ganglion of earthworm *Pheretima communissima* *Sci. Rep. Tôhoku Univ. Ser. 4 (Biol)*. 33, 429-439.

TAKEUCHI, N. (1968 a). On the relationship between neurosecretory granules and intracellular membraneous cell organelles in the neurosecretory cells of cerebral ganglion of the megascolecid earthworm. *Science Reports of the Tôhoku University*, series 4, 34, 1-11.

TAKEUCHI, N. (1968 b). Structure of intraganglionic capillary in neuropil of cerebral ganglion of earthworm with special reference to the neurosecretion. *Science Reports of the Tôhoku University*, series 4, 34, 13-20.

TEICHMANN, I., AROS, B. (1966). Fluorescence microscopic demonstration of catecholamine containing nerve cells and fibres in the central nervous system of invertebrates. *Acta morphologica*, Budapest, 14, 350-351.

TEICHMANN, I., AROS, B., VIGH, B. (1966). Histochemical studies on Gomori-positive substances III. Examination of the earthworms neurosecretory system (Lumbricus herculeus, Eisenia foetida). *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 17, 329-357

TEICHMAN, I., GOSLAR, H.G. (1968). Enzymhistochemische studien am nervensystem. II. Das verhalten einiger oxidoreduktasen im hypopharyngeal-ganglion des regenwurmes (Eisenia foetida). *Histochemie*, 13, 57-69.

THOUVENY, Y. (1967). Les systèmes histogénétiques et la différenciation cellulaire dans la morphogenèse des Annelides Polychètes. *Archives de zoologie expérimentale et générale*, 108, 347-386.

TORK, I., AROS, B., KISS, J., VIGH, B. (1966). Morphological examination of the metabolism in the secretory cells of the nervous system. I. Autoradiographic study of the incorporation of  $S^{35}$  labelled cysteine and methionine into the neurosecretory system of the earthworm (Eisenia foetida and Lumbricus herculeus.) *Acta Biologica Academiae Scientiarum hungaricae*, 17, 185-198.

UDE, J., GERSCH, M. (1968). Eine besondere konfiguration membrangebundener polysomen in neurosekretorischen zellen des zentralnervensystems eines Anneliden (Enchytraeus albidus) General and comparative Endocrinology, 10, 429-433.

VALEMBOIS, P. (1971 a). Etude ultrastructurale des coelomocytes du Lumbricien Eisenia foetida (Sav). Bull. Soc. Zool. France, 96, 59-72.

VALEMBOIS, P. (1971 b). Dégénérescence et régénération de l'épiderme à la suite d'une xénogreffe de paroi du corps entre Lumbriciens. C.R. hebd. Séances Acad. Sci., Paris, D. 272, 2717-2719.

VIGH-TEICHMANN, I., GOSLARD, H.G. (1969). Enzyme-histochemical studies on the nervous system of the earthworm. Annales d'Endocrinologie, 30, 55-60.

WAREMBOURG, M. (1968). Contribution à l'étude des différentes types de neurones dans la chaîne ventrale des Nereidae (Annélides Polychètes). Thèse 3<sup>e</sup> cycle, Lille, 1-126.

WEITZMAN, M. (1969). Ultrastructural study on the release of neurosecretory material from the sinus gland of land crab, Gecarcinus lateralis. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 94, 147-154.

WELSH, J.M., MOORHEAD, M. (1960). The quantitative distribution of 5-hydroxytryptamine in the invertebrates, specially in their nervous systems. *Journal of Neurochemistry*, 6, 146-169.

ZACCHELO, F., BESON, P.F., GIANNELLI, F., MCGUIRE, M. (1972). Induction of adenylate cyclase activity incultured human fibroblasts during increasing cell population density. *Biochem. J.*, 126, 27.

ZAHID, Z.R. (1977). A light microscopical study on the neurosecretory system of Allolobophora caliginosa and Allolobophora rosea Annelida Oligochaeta. *Bull. Biol. Res. cent. Publ. (Baghdad)*. 9, 75-92.

ZAHID, Z.R., GALDING, D.W. (1975). The cerebral neurosecretory system, secretory endfoot system and infracerebral gland-a probable neuroendocrine complex in Nephtys (Annelida, Polychaeta) *Acta Zoologica* 56, 11-28.



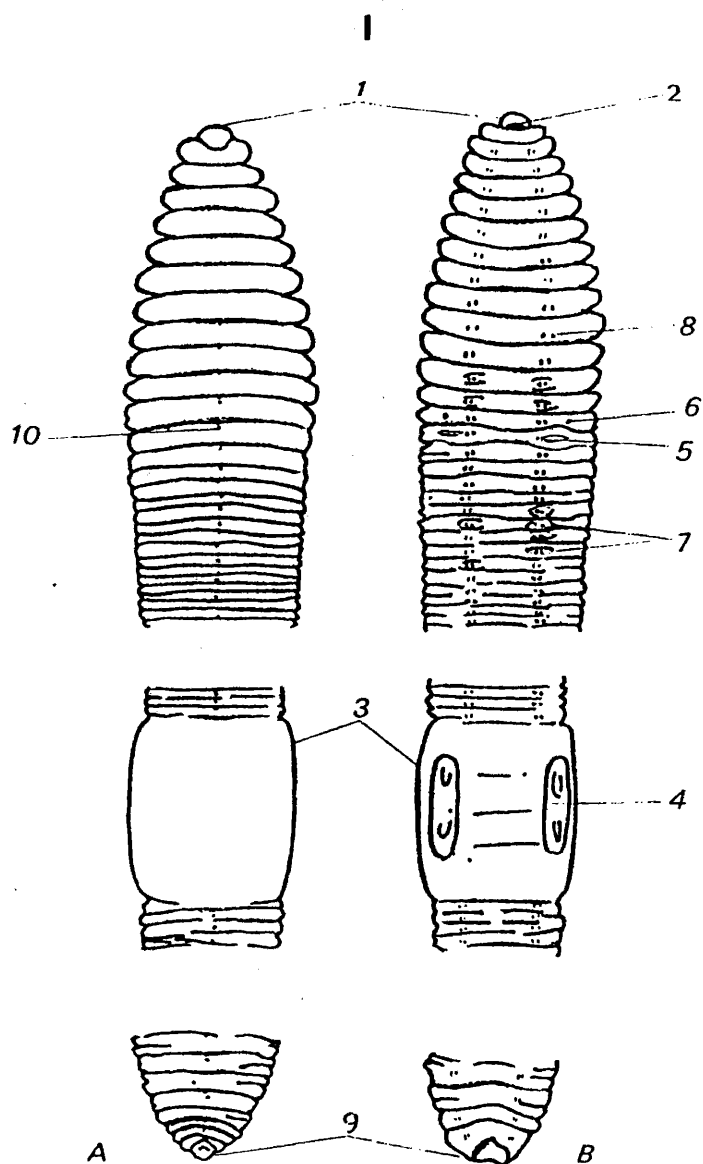


Fig. 1.- Esquema de *Allolobophora*. A: región dorsal; B: región ventral; 1: prostomio; 2: boca; 3: clitelo; 4: tuberculos pubertarios; 5: poros genitales ♂; 6: poros genitales ♀; 7: papilares sexuales; 8: quetas; 9: pigidio; 10: poros dorsales.



Fig. 2.- A. molleri adulta (sin clitelo). Disposición de la lombriz para serle extirpados los ganglios cerebroides. 2x.

III



Fig. 3.- A. molleri adulta (sin clitelo). Detalle del corte realizado en los segmentos anteriores para la extirpación del cerebro. (flecha). 5x



IV

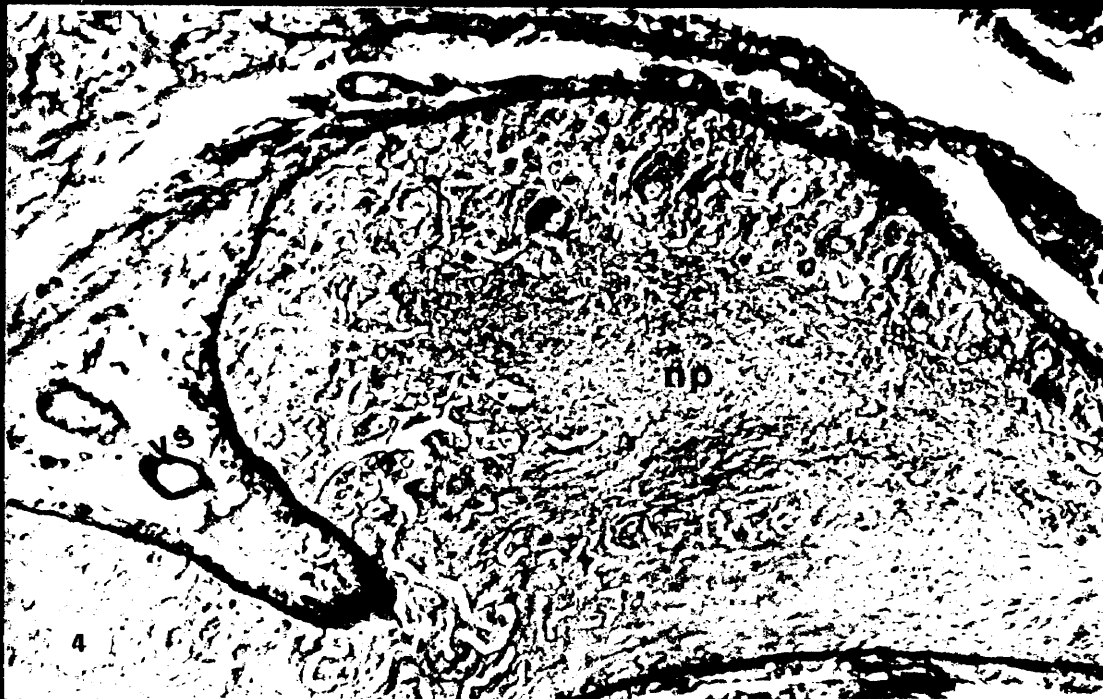
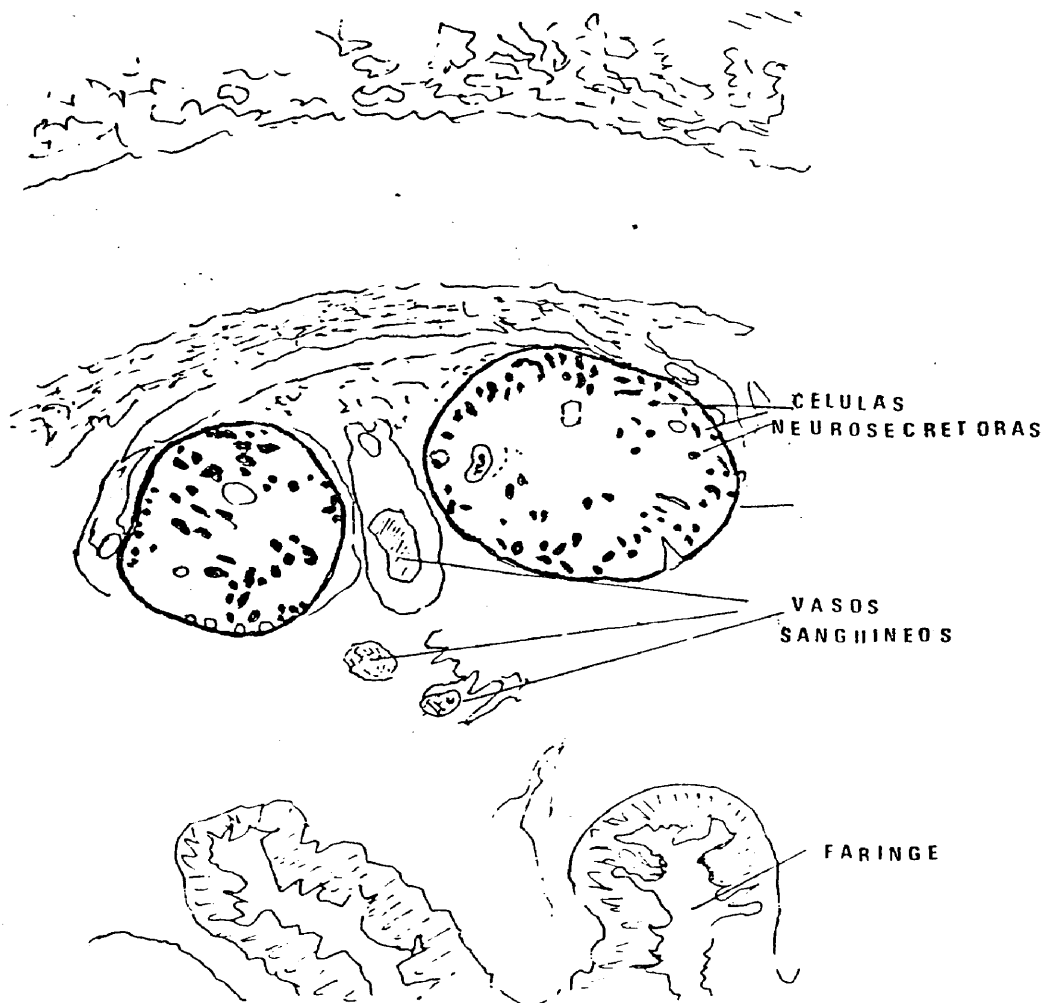


Fig. 4.- A. molleri adulta (sin clitelo). Corte trans  
versal del ganglio cerebroide. Observese el neuropilo  
central (np) rodeado de pericariones neurosecretores  
de diverso tamaño y con diferente afinidad tintorial.  
VS: vaso sanguíneo. Azan de Heidenhain. 1100x.

V



G A N G L I O   C E R E B R O I D E

VI



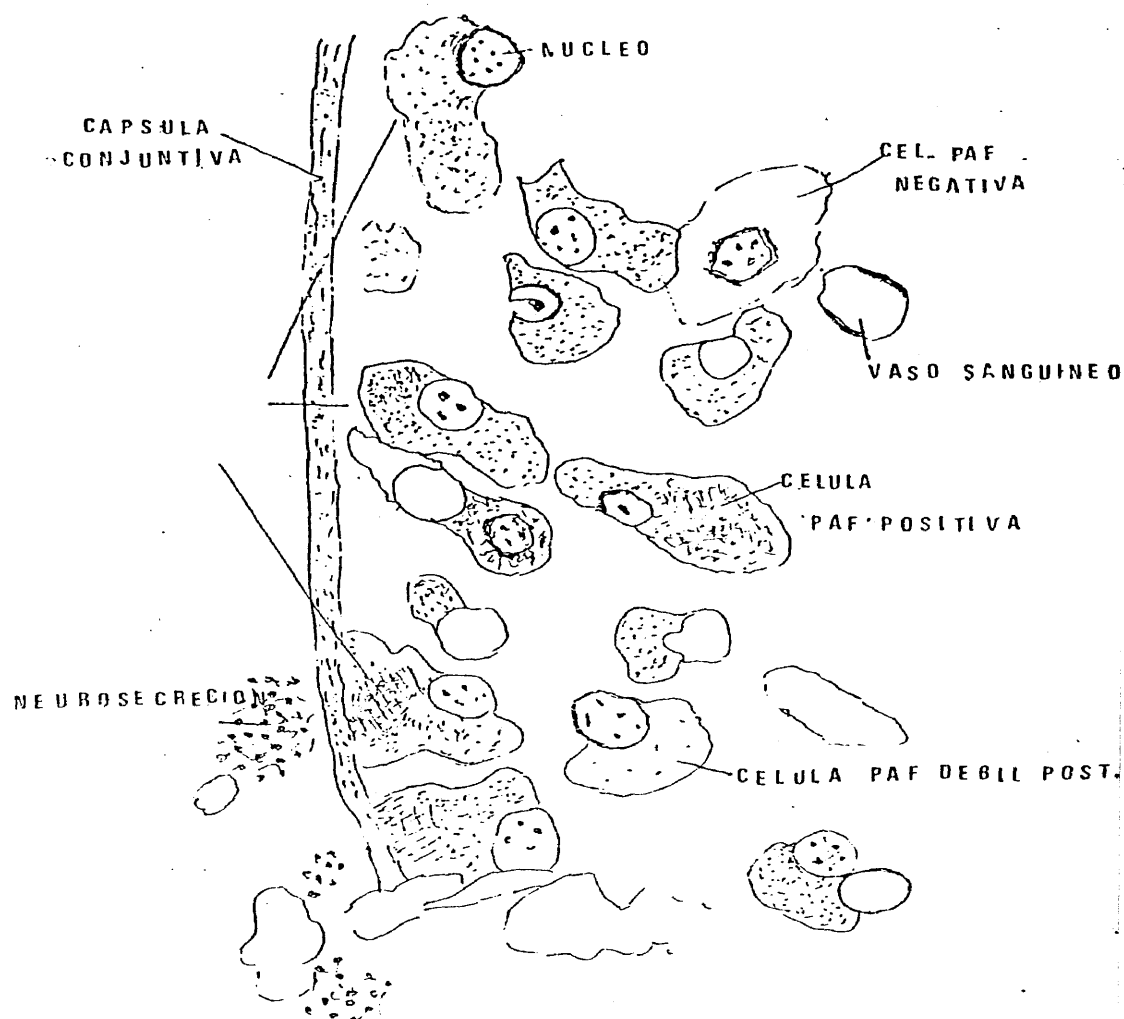
Fig. 5.- A. molleri clitelada. Corte transversal bastante posterior de un solo ganglio cerebroide en donde se pueden observar células neurosecretoras con gran afinidad tintorial. c n: célula neurosecretora. Tinción de Cameron y Steele. 1100x.

# VII



Fig. 6.- A molleri clitelada. Corte transversal del ganglio cerebroide con escasas células neurosecretoras PAF positivas. Sección muy anterior del cerebro. 1: célula neurosecretora PAF-positiva; 2: célula neurosecretora PAF-negativa; VS: Vaso sanguíneo. Tinción por fucsina-paraldehído (Gomori modificado por Cameron y Steele). 1100 x.

# VIII



DETALLE DEL GANGLIO  
CEREBROI DE

IX



Fig. 7.- A. molleri clitelada. Corte transversal del cerebro. Detalle de las células Gomori positivas, después de la tinción con la fucsina-paraldehído de Cameron y Steele; 1: célula neurosecretora PAF positiva; 2: célula neurosecretora PAF negativa; 3: célula PAF débil positiva; N: Nucleo; CC: capsula conjuntiva; nes: neurosecreción. 4100 x.

X



Fig. 8.- A. caliginosa clitelada. Corte transversal del cerebro en donde se puede observar la disposición de las células neurosecretoras agrupadas en la región dorsal, principalmente en la zona intercerebral y cerca de las comisuras laterales. Tinción con Azan de Heidenhain. 1750x.

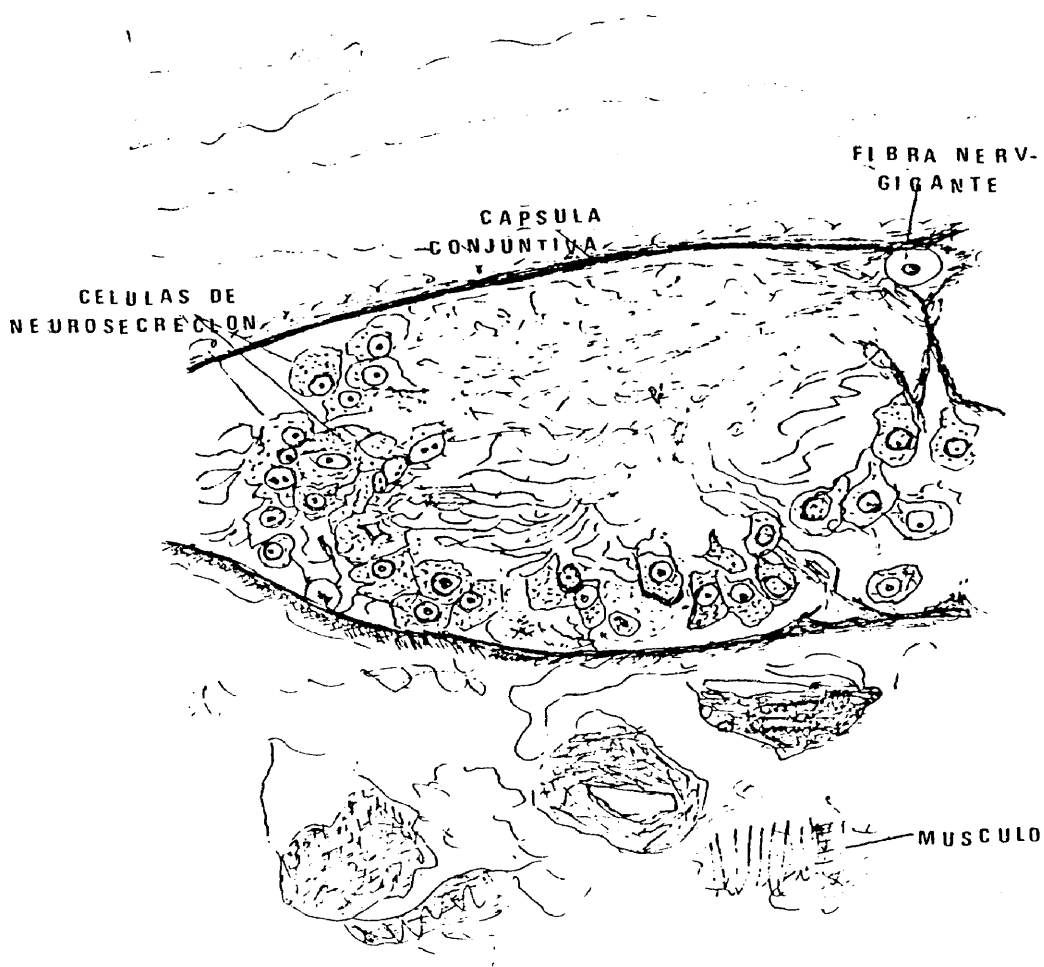
XI



Fig. 9.- A. caliginosa clitelada. Corte transversal del cerebro. Detalle de las células neurosecretoras con un pericarion teñido de rojo por el Azan. En los núcleos, muy patentes, se observa uno o dos nucleolos  
cn: célula neurosecretora; fc: fibra conjuntiva; np: neuropilo. Azan. 4100x.



XII



G A N G L I O    S U B F A R I N G E O



Fig. 10.- *A. molleri* adulta (sin clítero). Corte transversal del ganglio subfaringeo. Observese las células neurosecretoras con gran afinidad tintorial. Fg: fibra gigante media; np: neuropilo; cc: capsula conjuntiva. Azan. 1100x.

XIV



Fig. 11.- A. molleri adulta (sin clitelo). Corte transversal del ganglio subfaríngeo bastante anterior. Obsérvese células neurosecretoras Gomori-positivas en la región ventrolateral de los ganglios.  
(X) Tinción con Gomori original. 420x.

XV



Fig. 12.- A. molleri adulta (sin clitelo). Corte transversal del ganglio subfaríngeo bastante posterior. Observese las células Gomori-positivas por toda la superficie del ganglio. Tinción con Gomori original. 675x.

XVI

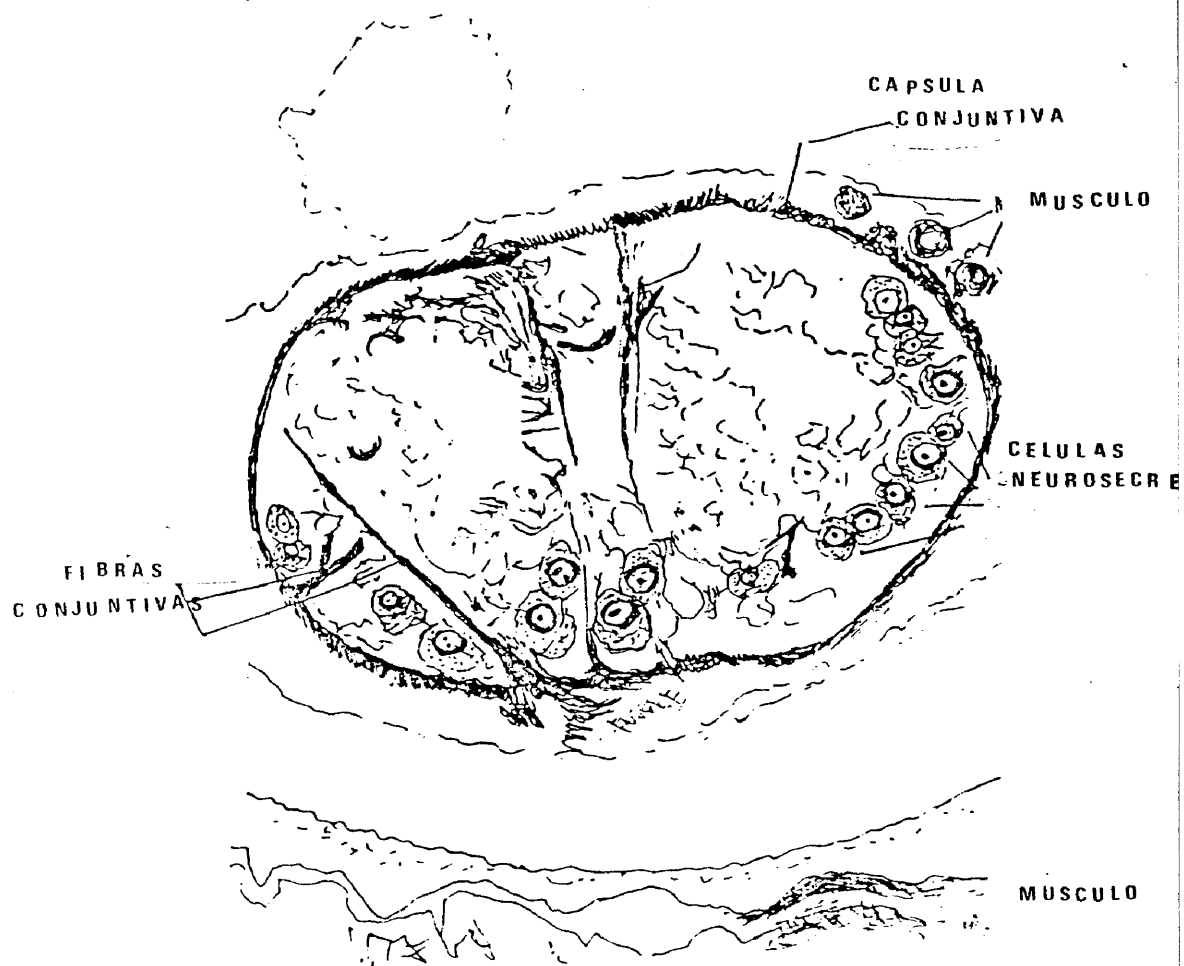


Fig. 13.- A. molleri clitelada. Corte transversal del ganglio subfaríngeo. Observese células neurosecretoras debilmente fucsínofilas. Tinción con fucsina-paraldehído de Cameron y Steele (Gomori simplificado). 1100 x.



Fig. 14.- A. molleri clitelada. Corte transversal de la región anterior del cuerpo, en el que se observa el ganglio cerebroide (gc) con gran actividad neurosecretora en sus células, y el ganglio subfaringeo (gs) con poca neurosecreción celular. Tinción de Cameron y Steele. 420 x.

XVIII



GANGLIO CADENA VENTRAL

XIX



15

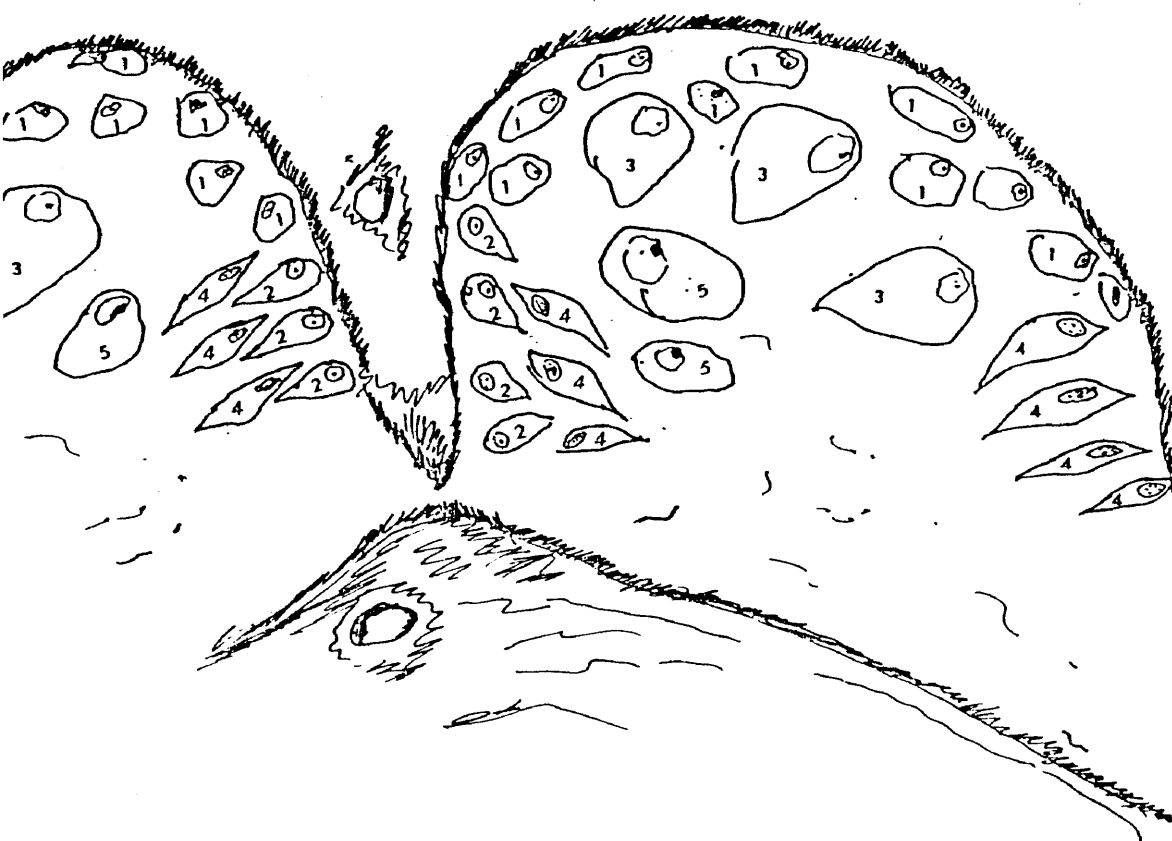
Fig. 15.- *A. molleri* adulta (sin clitelo). Corte transversal de un ganglio de la cadena nerviosa ventral cuyas células neurosecretoras presentan una moderada afinidad tintorial. Obsérvese la capsula conjuntiva (cc) que rodea todo el ganglio. En el interior del mismo se ve como se separa las células neurosecretoras del neuropilo central; Fg: fibra gigante media; fm: fibras musculares, que facilitan la contracción de la cadena nerviosa. Azan de Heidenhain. 1100x.





Fig. 16.- A. molleri clitelada. Corte transversal de un ganglio de la cadena nerviosa ventral, donde se observa escasa afinidad tintorial en las células neurosecretoras. Tinción con Azan de Heidenhain. 1100 x.

# XXI



Esquema relativo al emplazamiento de las células neurosecretoras tipos 1, 2, 3, 4 y 5, en el ganglio cerebroide de A. caliginosa.

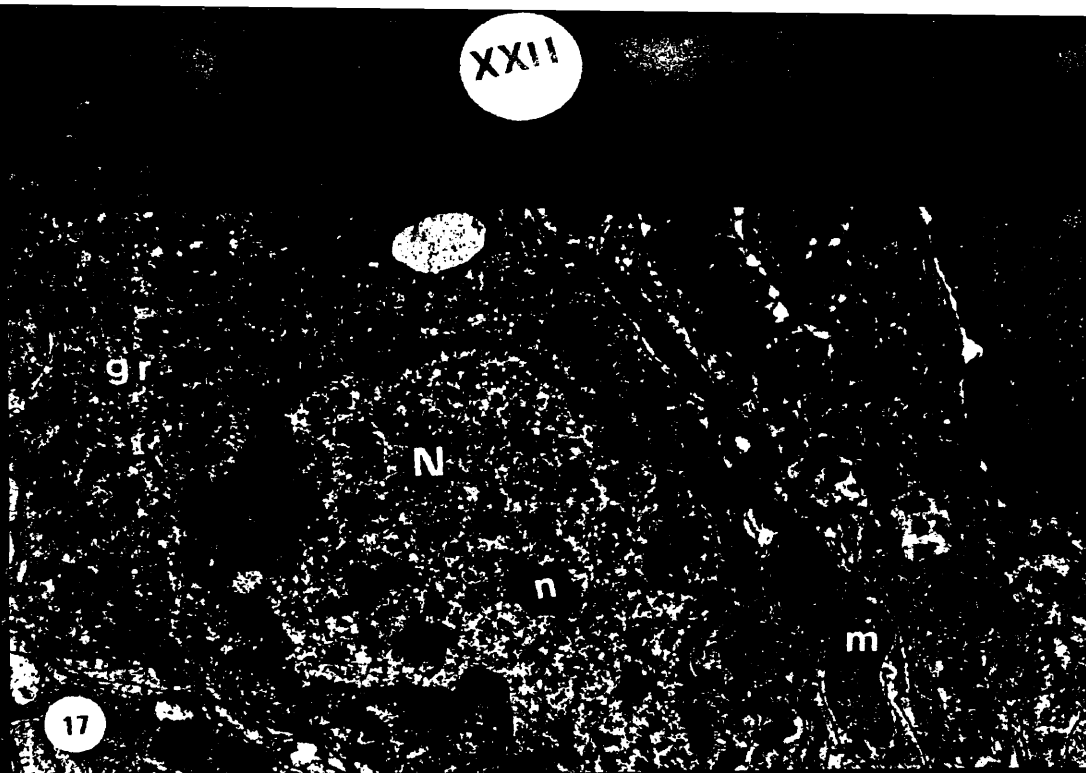


Fig. 17.- A. Caliginosa clitelada. Celula neurosecretora cerebral "tipo 1" conteniendo granulos densos a los electrones, con un gran núcleo y acúmulos de cromatina dispersos en él. N: núcleo; n: nucleolo; m: mitocondria; gr: gránulos de neurosecreción. 25.000x.

XXIII

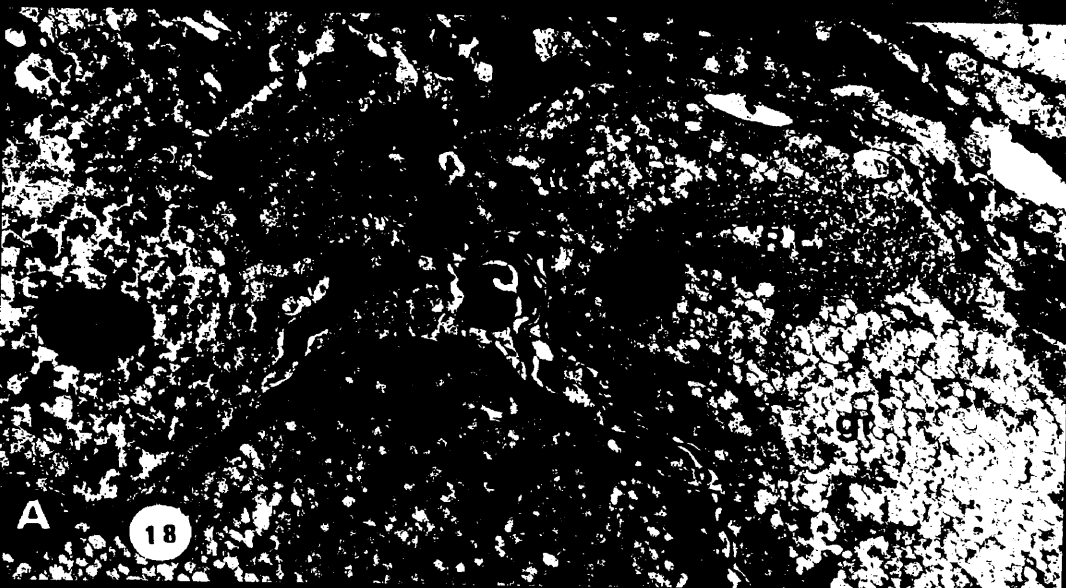


Fig. 18.- A. caliginosa clitelada. Celula neurosecre-  
tora cerebral "tipo 2" situada en la parte derecha (A).  
En la zona izquierda (B) se ve un núcleo provisto de  
un grueso nucleolo de una celula de "tipo 1". Citoplas-  
ma con vesículas transparentes a los electrones (gr)  
RE: reticulo endoplásmico rugoso. 12.500x.

XXIV

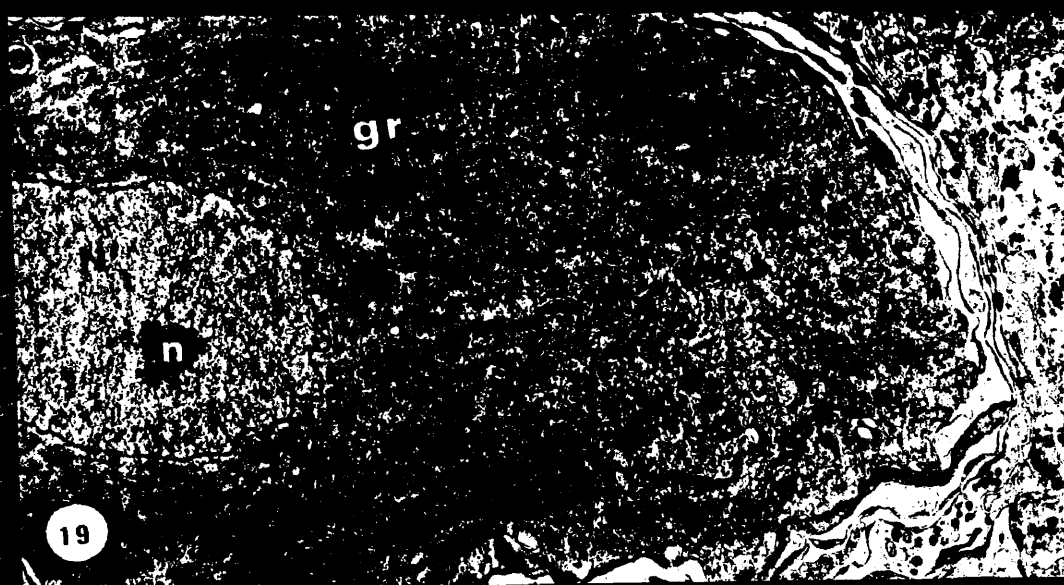


Fig. 19.- A. caliginosa clitelada. Celula neurose-  
cretora cerebral "tipo 3". Son celulas muy grandes  
y poco numerosas. Núcleo provisto de un grueso nucleo  
lo. Citoplasma con pequeños gránulos densos a los elec  
trones. 10.000x.

XXV



Fig. 20.- *A. caliginosa* clitelada. Célula neurosecretora cerebral "tipo 4". Gránulos de neurosecreción con una zona central finamente granular o densa rodeada de una zona más clara y una membrana. N: núcleo; RE: retículo endoplasmico rugoso. 50.000x.



Fig. 21.- *A. caliginosa* clitelada. Celula neurosecretora cerebral "tipo 4". Gránulos con zona central más o menos densa rodeada de otra zona mas clara. m: mitocondria; r: ribosomas; RE: retículo endoplásmico rugoso. 32.500x.

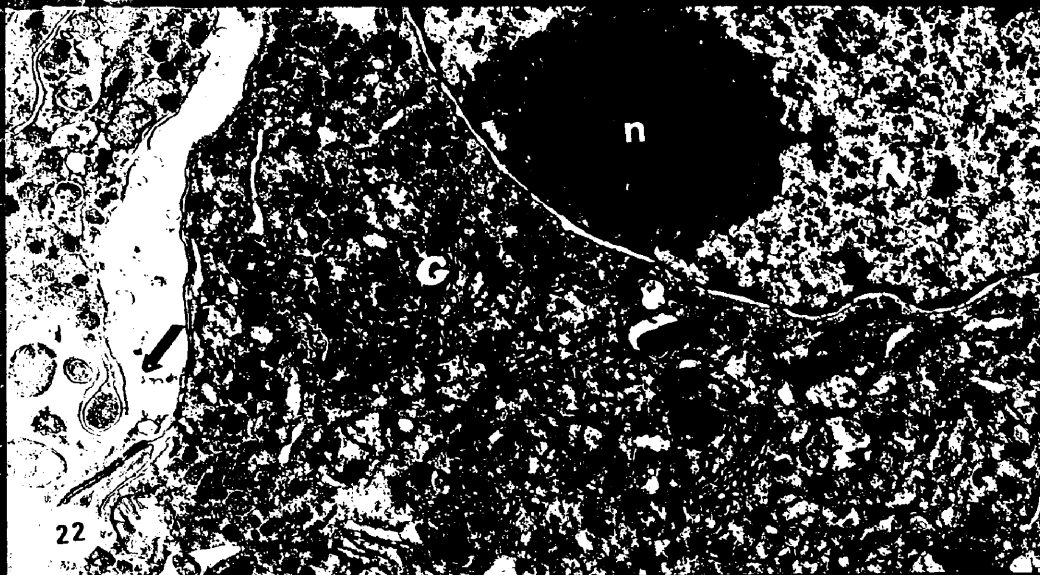


Fig. 22.- A. caliginosa clitelada. Celula neurosecre-  
 tora cerebral "tipo 5" provista de un gran núcleo y  
 un voluminoso nucleolo muy próximo a la membrana nu-  
 clear. G: aparato de Golgi; m: mitocondria; N: núcleo  
 n: nucleolo. Formación de un gránulo elemental de  
 neurosecreción a partir de vesículas golgianas (fle-  
 cha). 25.000x.